

DE LA CARACTÉRISATION
DES
ESSENCES OFFICINALES
PAR
CHROMATOGRAPHIE
EN COUCHE MINCE ET SUR PAPIER

THÈSE
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le 11 juillet 1963

PAR

Maxime GODON

PHARMACIEN

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Président..... M. R. PARIS,

Examineurs.. { M. A. LE HIR, *Professeur*
 { M. P. DELAVEAU, *Professeur*

IMPRIMERIE KAPP
VANVES - SEINE
1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DE LA CARACTÉRISATION
DES
ESSENCES OFFICINALES
PAR
CHROMATOGRAPHIE
EN COUCHE MINCE ET SUR PAPIER

THÈSE
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le 11 juillet 1963

PAR

Maxime GODON

PHARMACIEN

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Président..... M. R. PARIS,

Examineurs.. { M. A. LE HIR, *Professeur*
 { M. P. DELAVEAU, *Professeur*

IMPRIMERIE KAPP
VANVES - SEINE

1963



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

- MM. G. VALETTE, O , C , Doyen.
M. M. JANOT, O , C , Assesseur,
P. MALANGEAU, O , Assesseur.
L. RODINEAU, , O , Secrétaire général.
L. JEANDEL, O , Secrétaire général adjoint.
L. JEANDEL, O , Secrétaire général adjoint.
Mme S. CERTAIN, O , Secrétaire.
M. L. ESPINASSE, O , Secrétaire.
G. FROISSART, , Secrétaire.

DOYEN HONORAIRE

- M. R. FABRE, C , C , Président de l'Académie de Médecine,
Membre de l'Institut.

PROFESSEURS HONORAIRES

- MM. M. DELÉPINE, C , C , Membre de l'Institut.
L. LAUNOY, O , O 
P. FLEURY, O , O 
M. MASCRÉ, O , C 
M. PICON, O , O 
C. BEDEL, , O 
R. FABRE, C , C , Président de l'Académie de Médecine,
Membre de l'Institut.

PROFESSEURS

- | | | |
|------|--|--|
| MM. | M. M. JANOT, O  , C  | Pharmacie galénique (T.). |
| | G. VALETTE, O  , C  | Pharmacodynamie (T.). |
| | R. PARIS,  , O  | Histoire naturelle des médicaments
simples d'origine végétale (T.). |
| | M. GUILLOT,  , O  | Physique (T.). |
| | J. GAUTIER,  , O  | Chimie organique (T.). |
| Mlle | S. LAMBIN,  , O  | Microbiologie (T.). |
| MM. | Y. RAOUL,  , O  | Physiologie (T.). |
| | J. COURTOIS,  , O  | Chimie biologique (T.). |
| | L. DOMANGE,  , O  | Chimie minérale (T.). |
| | P. CRÉTÉ,  , O  | Botanique (T.). |
| | R. TRUHAUT, O  , O  | Toxicologie et Hygiène industrielle
(T.). |
| | A. MORETTE,  , O  | Hydrologie (T.). |
| | R. CAVIER, O  , O  | Parasitologie (T.). |
| | A. QUEVAUVILLER, O  , O  | Hygiène et Education sanitaire (T.). |
| | R. MOREAU,  , O  | Pharmacie chimique (T.). |
| | J. GUY, O  , O  | Mathématiques appliquées aux
sciences physiques et biologiques
(T.P.). |
| | A. GERMAN, O  , O  | Virologie et Sérologie (T.P.). |
| | M. PIETTE,  , O  | Biologie sanguine (T.P.). |
| | P. MALANGEAU, O  , O  | Chimie analytique (T.). |
| | M. GIRARD, O  , O  | Chimie appliquée à l'expertise (T.). |
| | G. DILLEMANN, O  , O  | Législation, Déontologie et Histoire
de la Pharmacie (T.). |
| | J. FLAHAUT, O  , O  | Minéralogie (T.P.). |
| | G. DEYSSON, O  , O  | Cytologie végétale (T.P.). |

PROFESSEURS

MM.	C. BOUDÈNE.....	Toxicologie et Hygiène industrielle (T.P.).
	A. LE HIR.....	Pharmacie galénique (S.C.).
	J. RENAULT, 	Chimie organique (S.C.).
	P. DELAVEAU.....	Matière médicale (S.C.).
	P. LARUELLE.....	Physique (S.C.).
	A. MANGEOT.....	Pharmacie galénique industrielle (S.C.).
	P. ROSSIGNOL.....	Pharmacodynamie.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	Y. COHEN.....	Sciences naturelles.
	G. LE MOAN.....	Toxicologie.
	H. RENAULT, 	Pharmacie chimique.
	C. PAOLETTI.....	Sciences appliquées.
	P. REYNAUD.....	Sciences physico-chimiques.
	J. POISSON.....	Sciences naturelles.
	A. DESVIGNES, 	Microbiologie.
	F. PERCHERON.....	Biochimie.
	J. SAVEL.....	Sciences naturelles.
	J. BORY.....	Sciences naturelles.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET.....	Parasitologie.
	A. CAVE (F.F.).....	Pharmacie chimique et galénique.
	P. CORRIEZ, 	Physique.
	C. DREUX.....	Électrochimie appliquée à l'analyse.
	P. GESTEAU,  , 	Physique biologique.
	J. GOUNELLE.....	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Biologie).
	H. GUÉRIN,  , 	Micrographie (3 ^e année), essais des drogues végétales.
	J. HARISPE,  , 	Chimie générale et pharmaceutique.
	J. HENRY.....	Chimie (4 ^e année).
Mme	J. HUBERT.....	Microbiologie.
MM.	R. LELUC.....	Microbiologie.
	M. LEMONNIER.....	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
Mme	S. LEMONTEY.....	Chimie (4 ^e année).
Mlle	S. LONGUEVALLE, 	Service des examens de Chimie.
Mlle	H. MORIN.....	Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments.
MM.	F. PELLERIN.....	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
	R. PERLES.....	Chimie biologique.
	J. PESTIS (F.F.).....	Biologie animale.
	R. POUILLAIN.....	Hématologie.
Mme	M. ROBERT.....	Sérologie.
Mlle	A. ROLLEN,  , 	Biologie végétale.
Mlle	L. SEGUIN (F.F.), 	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Physico-chimie).
Mme	SEILLER (F.F.).....	Pharmacie galénique industrielle.
M.	J. YONGER (F.F.).....	Chimie analytique (1 ^{re} année).

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	J. MANDEREAU.....	Chef de travaux pratiques de Pharmacotechnie galénique.
----	-------------------	---

BIBLIOTHÈQUE

Mlle	Y. RUYSSSEN,  , 	Conservateur, chargé de la Direction.
Mlle	S. LAVAUD, 	Conservateur.
Mme	G. KREHMER, 	Conservateur.
Mme	A. DESGRIPPES, 	Bibliothécaire.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PARIS

*Professeur de Matière Médicale
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Directeur
de Recherches au Laboratoire National
de la Santé Publique
Chevalier de la Légion d'Honneur*

Qui m'a fait le grand honneur de diriger ces travaux et de présider le jury de cette thèse.

Témoignage de profonde gratitude et de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. LE HIR
Professeur
à la Faculté de Pharmacie de Paris

Qui a accepté de juger ce travail.

Avec l'expression de mes respectueux remerciements.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR *P. DELAVEAU*
Professeur
à la Faculté de Pharmacie de Paris

Qui a bien voulu s'intéresser à ce travail.
Avec mes sentiments reconnaissants.

A la mémoire de mon Père

A tous les Miens

A mes Amis

PLAN DU TRAVAIL

	Pages
INTRODUCTION	15
Première partie : TRAVAUX ANTÉRIEURS	
I. — Chromatographie sur colonne.....	20
II. — Chromatographie en couche mince	21
III. — Chromatographie sur papier.....	30
Deuxième partie : TRAVAUX PERSONNELS	
CHAPITRE I. — Chromatographie en couche mince	36
CHAPITRE II. — Chromatographie sur papier hydrofugé	46
A. Agents d'hydrofugation utilisés	47
B. Imprégnation du papier	50
C. Dépôt des substances	51
D. Développement.....	51
E. Révélation.....	52
Résultats-discussion	54
CHAPITRE III. — Chromatographie sur papier après mercuration....	61
Généralités	61
Partie expérimentale	63
Résultats-discussion	67
CHAPITRE IV. — Applications aux essences officinales.....	70
Essences étudiées	70
Techniques utilisées	71
Interprétation.....	73
Monographies des essences officinales :	
Anis (comparaison avec l'essence de Badiane)	77
Bergamote.....	80
Cannelle de Ceylan (comparaison avec l'essence de la Can-	
nelle de Chine)	83
Chénopode vermifuge	87
Citron	89
Eucalyptus	93
Girofle (comparaison avec l'essence de feuilles)	96
Lavande (comparaison avec l'essence d'Aspic)	101
Lavandin	105
Menthe poivrée	106
Niaouli	110
Orange douce	113
Persil	115
Romarin	118
Rose	120
Térébenthine	123
Thym	125
Conclusions	128
CHAPITRE V. — Applications à quelques formes galéniques.....	129
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	132
BIBLIOGRAPHIE.....	136

INTRODUCTION

Les diverses techniques chromatographiques ont suscité un grand nombre de publications ayant trait à l'analyse d'espèces chimiques les plus variées. Toutefois les applications aux huiles essentielles ou à leurs composants furent assez tardives dans l'ensemble ; si les premières séparations de composés terpéniques simples, par adsorption sur colonne, furent entreprises entre 1933 et 1938, la majorité des travaux furent effectués après la fin de la dernière guerre, mais sans sortir du domaine de la recherche.

La chromatographie en couche mince, plus récente et pleine de promesses, a été perfectionnée et adaptée aux composants des essences en 1951 par KIRCHNER et collaborateurs.

Dans le même domaine d'application, la chromatographie sur papier s'est développée simultanément, utilisant le plus souvent des papiers traités (hydrofugés, ou imprégnés de substances hydrophiles) et les produits de transformation des substances étudiées.

Enfin la chromatographie en phase gazeuse, réalisée expérimentalement en 1952 par JAMES et MARTIN, s'est montrée l'une des méthodes les plus efficaces et les plus fines pour séparer les corps gazeux ou volatilisables, et déterminer leurs proportions dans les mélanges. Mais elle nécessite un appareillage onéreux, des mises au point souvent délicates ; elle est d'interprétation parfois difficile. Elle ne satisfait pas encore entièrement aux exigences pratiques des laboratoires de contrôle.

Pour répondre à celles-ci, il importe de disposer de méthodes simples et rapides. Dans les Pharmacopées, les essences sont le plus souvent identifiées par leurs constantes physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, solubilités). Ces déterminations donnent des valeurs globales, mais ne renseignent pas en détail sur la présence des divers constituants et leurs proportions relatives, même si parfois le composé principal est dosé.

La mise en évidence et, si possible, l'identification des huiles essentielles ont leur importance dans le contrôle de ces matières premières aisément falsifiées.

Pour contribuer à combler cette lacune des Pharmacopées, ce sujet me fut confié dès 1959 par mon Maître, le Professeur PARIS.

Ce travail rentrait bien dans le cadre des recherches effectuées depuis plusieurs années au Laboratoire de Matière médicale, sur l'analyse des matières premières végétales et de leurs constituants. Depuis les premiers travaux de PARIS et VIEJO en 1956, sur la chromatographie sur papier des drogues officinales, de nombreuses publications ont eu trait à la caractérisation et au dosage des alcaloïdes, des flavonoïdes, des dérivés coumariniques (PARIS et FAUGERAS) et naphthoquinoniques (PARIS et DELAVEAU), des

dérivés anthracéniques (PARIS et DURAND), des hétérosides cardio-toniques (PARIS), des hétérosides sulfurés (DELAVEAU), des glucides des Champignons (PARIS, DURAND et BONNET), des colorants végétaux (PARIS et ROUSSELET), des antibiotiques (PARIS et THÉALLET). La technique des chromatoplaques a également fait l'objet de divers travaux, notamment sur les alcaloïdes et les hétérosides (PARIS).

Par leur simplicité, leur facilité d'application et leur souplesse, la chromatographie sur plaque et la chromatographie sur papier ont été préférées, pour réaliser ce travail.

Au cours de ces recherches qui, en raison de mes occupations professionnelles, ont été parfois ralenties, j'ai eu connaissance de plusieurs publications ayant trait à des sujets voisins. Elles seront mentionnées avec les travaux antérieurs.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, c'est pour moi un agréable devoir d'exprimer ma vive et respectueuse reconnaissance à mon Maître le Professeur R. PARIS qui m'a confié le sujet de cette thèse et m'a constamment guidé au cours de ces recherches. Sa grande expérience scientifique et sa sollicitude constante m'ont apporté une aide précieuse et m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'assure de toute ma gratitude M. le Professeur A. LE HIR qui m'a toujours témoigné beaucoup de bienveillance au cours de mon activité professionnelle et qui a bien voulu accepter de faire partie du jury de cette thèse.

M. le Professeur P. DELAVEAU s'est intéressé à ce travail et a bien voulu le juger. Je l'en remercie chaleureusement ainsi que des critiques judicieuses dont il m'a fait bénéficier.

Je dois également adresser mes plus vifs remerciements au Conseil de la Faculté qui m'a accordé un Prix de fondation récompensant les travaux d'un chercheur dans le domaine de la Matière médicale ou de la Pharmacie galénique.

A Mme MOYSE MIGNON, Assistante de la Chaire de Matière médicale, j'exprime ma sincère reconnaissance pour la sollicitude avec laquelle elle a constamment soutenu mes efforts et pour l'aide qu'elle m'a prodiguée dans la rédaction de cette thèse.

Je ne saurais oublier que ces recherches ont été conduites à leur terme grâce aux moyens de travail et aux facilités mis à ma disposition par la Coopération Pharmaceutique Française. Je suis heureux d'en remercier M. SALMON et de l'assurer de mon respectueux attachement.

Ma reconnaissance va à M. le Professeur P. FLEURY, à M. le Professeur J. RENAULT, pour leurs conseils bienveillants et l'intérêt suivi qu'ils ont manifesté au cours de ces recherches ; à M. M. MALMY, Chef de Travaux honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui m'a introduit auprès de M. le Professeur R. PARIS ; à M. le Docteur R. WEITZ, Assistant honoraire de la Chaire de Matière médicale, qui m'a fait bénéficier de sa grande érudition dans le domaine bibliographique.

Je remercie toutes les Firmes qui ont bien voulu me fournir

gracieusement les produits nécessaires à l'expérimentation : Alcan et Cie, Chiris, les Dérivés Résiniques et Terpéniques, Electrochimie-Ugine, Gattefossé-S.F.P.A., Imperial Chemical Industries, Laborma, Lambert-Rivière, Laserson et Sabetay, Méro et Boyveau, Minnesota de France, Nobel-Bozel, Péchiney-Saint-Gobain, Progil, Rhône-Poulenc, Quarré, Service des Poudres, S.E.P.P.I.C., Solvic, Vilcoq.

Enfin je ne saurais passer sous silence tous ceux, Confrères, Amis ou Collaborateurs qui m'ont apporté leur aide généreuse et leurs encouragements. Je les assure de toute ma reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE

TRAVAUX ANTÉRIEURS

Ces dernières années, divers auteurs : GUENTHER (1953, 1955, 1957, 1959, 1961), RIGANESIS (1955, 1956), CALVARANO (1959, 1960), ont publié des revues bibliographiques très documentées sur les applications de la chromatographie aux essences ou à leurs constituants.

Si les travaux fondés sur la chromatographie sur colonne ont été très nombreux, de nouvelles techniques, davantage applicables aux essais, sont aujourd'hui en plein développement : chromatographie sur papier, en couche mince, et en phase gazeuse.

Relativement peu de travaux portent sur les essences elles-mêmes ; la plupart se sont attachés à la caractérisation d'un nombre limité de constituants. Ne pouvant totalement passer sous silence les publications se rapportant à ces derniers, nous les avons citées très brièvement, étant donné leur filiation avec les études sur les essences ou leur intérêt pratique possible.

Dans cette revue bibliographique nous rappellerons rapidement ce qui a trait à la chromatographie sur colonne, dont la chromatographie sur couche mince n'est d'ailleurs qu'une variante ; nous insisterons sur cette dernière technique, en particulier dans les détails pratiques, parce qu'elle fournit à elle seule les résultats les plus complets.

La chromatographie sur papier n'est pas d'un emploi aussi général, mais elle s'est montrée précieuse par la caractérisation de groupes de substances ayant la même fonction (alcool, phénol, carbonyle, ester, etc.).

En ce qui concerne les applications aux huiles essentielles de la chromatographie en phase gazeuse, nous renvoyons aux revues spécialisées et, notamment, au travail de Mlle LONGUEVALLE (1960).

I. - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Les travaux utilisant cette méthode ont surtout pour but la séparation et la purification des principes immédiats des essences. Souvent elle fait suite à la distillation fractionnée, et précède diverses déterminations physico-chimiques (spectrophotométrie, mesure du point de fusion des dérivés, etc.). Comme nous l'avons déjà signalé, elle n'est généralement pas applicable à l'analyse pratique courante.

On subdivise classiquement la chromatographie sur colonne en chromatographie d'adsorption, de partage et par échange d'ions.

1) Chromatographie par adsorption

Les adsorbants qui ont été utilisés pour les huiles essentielles et leurs composants sont les suivants : alumine, acide silicique, kieselguhrs (célite, etc.), certains silicates (Magnésol, Florisil), charbon activé, carbonate et sulfate de calcium, magnésie, carbonate de magnésie.

Les solvants de développement, employés purs ou en associations binaires, sont également classiques, soit, dans l'ordre du pouvoir éluant croissant : hydrocarbures extraits du pétrole (pentane, hexane, heptane, iso-octane, éther de pétrole, ligroïne), tétrachlorure de carbone, benzène, chloroforme, chlorure de benzyle, éther éthylique, acétone, éthanol, méthanol.

2) Chromatographie de partage

Un certain nombre de publications ont trait à la chromatographie de partage sur colonne. Elles concernent la séparation des mêmes substances, avant ou après transformation chimique, sauf toutefois les hydrocarbures pour lesquels cette technique paraît plus difficilement applicable.

Le kieselguhr, la Célite, l'acide silicique sont souvent utilisés comme supports de la phase stationnaire.

Les produits utilisés pour réaliser celle-ci sont : l'eau, le méthanol, le tricerésylphosphate, le nitrométhane, le benzène, les silicones, auxquels il convient d'ajouter le caoutchouc et les polyamides.

Les solvants pour les phases mobiles sont : l'éther de pétrole, l'iso-octane, le chloroforme, l'acétone, le butanol, l'éthanol, le méthanol, le formamide, l'eau.

3) Chromatographie par échange d'ions

Quelques travaux ont trait aux composants des huiles essentielles, mais, à notre connaissance, aucun aux essences elles-mêmes.

11. -- CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

La chromatographie en couche mince, également dénommée chromatographie sur plaque, constitue un perfectionnement de la technique sur colonne.

A l'heure actuelle encore, elle utilise le plus souvent les phénomènes d'adsorption.

La première application de cette technique se trouve dans les travaux de IZMAÏLOV et SHRAIBER (1938).

Mais étant donné les difficultés dues à la mobilité des poudres sèches d'adsorbants, d'autres auteurs ont imaginé des moyens de remédier à ces inconvénients :

Ainsi WILLIAMS a proposé en 1946 d'inclure l'adsorbant entre deux plaques de verre dont la surface supérieure est munie d'un petit trou rond central par lequel sont introduits la prise d'essai, puis le solvant de développement.

MEINHARD et HALL (1949), (1950), ont préféré recourir à une seule plaque de verre sur laquelle ils étalent l'adsorbant lié grâce à une amylopectine d'« amioca ». Ce produit a l'avantage de se gélifier à une température relativement basse, et d'éviter assez bien la formation de grumeaux ou de pellicules superficielles. Ce procédé de développement radial était destiné à la séparation d'ions inorganiques.

C'est alors que KIRCHNER, MILLER et KELLER (1951), considérant la chromatographie sur colonne comme inadaptée à la révélation des substances incolores ou celle sur papier insuffisante pour la révélation des composés terpéniques, ont imaginé de combiner les avantages de ces méthodes après s'être inspirés de la technique de MEINHARD et HALL (1949). Ils modifièrent celle-ci en procédant cette fois à un développement longitudinal sur des lames de verre de $1,3 \times 13$ cm. Après activation par la chaleur, puis sous vide en présence d'anhydride phosphorique ou de potasse, les lames sont développées dans des tubes à essai. Les auteurs indiquèrent plusieurs solvants pour la préparation de la phase mobile et ont retenu comme le meilleur, le mélange hexane — acétate d'éthyle (85-15).

Grâce à cette technique, KIRCHNER et coll. ont pu séparer et révéler très efficacement divers constituants d'huiles essentielles. Ils ont proposé le nom de « Chromatostrips » aux lames ainsi préparées.

Après avoir essayé divers adsorbants purs ou en association, les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acide silicique lié soit avec l'amidon, soit avec le plâtre de Paris.

Les espèces chimiques suivantes, très répandues dans les huiles essentielles, ont été chromatographiées : limonène, pinène, pulégone, camphène, géraniol, carvone, cymène, α -terpinéol, nopol, 1-8-cinéol, aldéhyde cinnamique, acétate de terpényle, acide caprique, camphre.

En 1953, MILLER et KIRCHNER ont complété ces premiers

résultats avec ceux obtenus avec d'autres substances terpéniques et ont utilisé de nouvelles phases mobiles.

Ces auteurs ont également proposé de combiner ou de dégrader préalablement les substances à chromatographier (formation de phénylhydrazones, de semicarbazones : estérification, oxydation, réduction, etc.).

Ces réactions sont pratiquées soit dans de petits tubes à essai, soit sur la substance déjà déposée sur la ligne de départ de la lame de verre enduite ou « chromatostrip ». Les produits de la réaction sont alors développés, puis révélés comme dans le cas général.

Les bases de la chromatographie en couche mince étant ainsi jetées, divers auteurs ont appliqué la méthode des chromatostrips, en la perfectionnant d'ailleurs par la suite, à la caractérisation des huiles essentielles ou de leurs constituants.

ONOE (1952) a préparé des « chromatostrips » en utilisant l'alcool polyvinyle comme liant. Il a séparé les 2,4-dinitrophénylhydrazones d'aldéhydes, dont le citral, en prenant le benzène saturé d'eau comme agent de développement. L'auteur a fait remarquer l'influence sur le Rf de la teneur en eau des couches.

FUKUSHI et OBATA (1953) ont séparé, à l'aide de l'éther de pétrole comme phase mobile, sept constituants de la fraction sesquiterpénique de « l'essence bleue de camphre ».

ITO, WAKAMATSU et KAWAHARA (1953), (1954), ont étudié la composition de la Menthe japonaise. Les « chromatostrips » sont développés avec le benzène ou avec le mélange hexane-acétate d'éthyle. La révélation est effectuée avec la vanilline en milieu sulfurique.

KATAYAMA (1955 a, b) a identifié divers composants de l'essence d'*Ulva pertusa* : α -pinène, d-limonène, linalol, α -terpinéol ; carvone, furfural, benzaldéhyde, propanal, citral, anisaldéhyde, citronellal, vanilline, iso-vanilline, aldéhyde cinnamique.

GOGROF (1957) a chromatographié l'essence de Patchouli à l'aide d'un mélange éluant composé de 5 pour cent de chloroforme et d'éther acétique dans l'heptane. Le révélateur utilisé est l'acide sulfurique. La technique a été étendue à des essences riches en terpénoïdes ou en sesquiterpènes.

STANLEY et VANNIER (1957), toujours avec la méthode des « chromatostrips », ont séparé les coumarines de l'essence de Citron en développant avec l'acétate d'éthyle à 15 et 25 pour cent dans l'hexane.

FURUKAWA (1959 a) a étudié les variations du Rf de la dinitrophénylhydrazone du camphre en fonction de la forme des chromatostrips et de l'épaisseur de l'adsorbant.

Le même auteur (1959 b) a étudié la séparation de divers composés (phénols, aldéhydes aromatiques, cétones, acides carboxyliques) sur couche d'acide silicique lié au plâtre. Les liquides mobiles sont : hexane — acétate d'éthyle (4 - 1 ou 3 - 2), benzène — éther éthylique (4 - 1), benzène.

La technique a ensuite été perfectionnée en utilisant des plaques de plus grandes dimensions :

Ainsi REITSEMA (1954) a opéré sur des plaques de $12,7 \times 17,8$ cm. Il a présenté un nouveau mode de révélation par la 2,4-dinitro-phénylhydrazine en présence de Rhodamine 6 G, et a rapporté les Rf obtenus pour 13 corps purs et 22 huiles essentielles.

FRYDMAN et coll. ont étudié sur couche d'acide silicique lié au gel d'amidon, 34 composés purs et 20 mélanges de constituants d'huiles essentielles. Le solvant de développement était l'hexane contenant 15 pour cent d'acétate d'éthyle. Les révélations ont été effectuées avec la fluorescéine, puis le brome, le chlorhydrate de 2,4-dinitrophénylhydrazine, l'acide sulfurique concentré, le soudan III (1957 a).

Les mêmes auteurs ont appliqué ensuite leur méthode à des essences diverses (1957 b, c).

Les essences de *Curcuma xanthorrhiza* et de *Curcuma longa* ont été différenciées sur plaque par WINKLER et LUNAU (1959).

BRIESKORN et WENGER (1960) ont étudié sur couche mince d'acide silicique (« Kieselgel G » Merck contenant 15 pour cent de plâtre) ainsi qu'en chromatographie en phase gazeuse, la composition de l'essence de Sauge.

WULFF et STAHL (1960) ont séparé suivant une technique similaire, les constituants d'essences d'*Acorus Calamus L.*, de diverses provenances.

Avec R. PARIS (1961), nous avons commencé à étudier les huiles essentielles officinales sur couche mince d'acide silicique lié au gel d'amidon.

Peu après, JASPERSEN-SCHIB (1961) a chromatographié sur couche de « Kieselgel G » des essences de Menthe poivrée de diverses origines. L'expérimentation a été également appliquée à la recherche des falsifications par les essences d'autres espèces de Menthe ou provenant d'un genre différent comme l'essence de Santal.

Un essai de chromatographie des essences de Crucifères a été réalisé sur plaque par P. DELAVEAU (1961) à l'aide du mélange benzène-hexane = 4:1 (Révélateurs : trichlorure d'antimoine, nitrate d'argent ammoniacal).

En 1962, JASPERSEN-SCHIB, en collaboration avec FLÜCK, a continué sa précédente étude (1961) par celle des essences de Lavandes, Romarin, Rose et de leurs falsifications. Solvant mobile utilisé : benzène-acétate d'éthyle = 95:5. Révélateurs : trichlorure d'antimoine, pentachlorure d'antimoine, vanilline sulfurique.

Signalons enfin que BRYANT (1955) a étudié les essences d'espèces hybrides d'*Eucalyptus* par chromatographie radiale sur couche mince de magnésol (silicate de magnésium hydraté).

Les auteurs suivants ont décrit la technique, les divers aspects et applications de la chromatographie sur couche mince : STAHL et coll., DEMOLE (1958, 1961), WOLLISH et coll. (1961), (1962).

Il paraît utile dès lors de décrire en détail les différents stades de la chromatographie sur couche mince en fonction des perfectionnements apportés par divers auteurs.

Préparation des plaques

Au début de leur expérimentation, KIRCHNER et coll. (1951) ont utilisé l'adsorbant en association avec la célite. Mais le pouvoir adsorbant se révélant insuffisant, ils suppriment cette dernière. Puis, après avoir éprouvé la valeur des divers adsorbants ci-après : oxyde de magnésium, alumine, alumine + acide silicique, hydroxyde de calcium, amidon, phosphate dicalcique, bentonite, carbonate de calcium, carbonate de magnésium, Filtrol, Filtrol X 202, Filtrol neutre E, Anex, Florisil, talc, acide silicique, ils concluent que le meilleur est l'acide silicique (qualité pour analyse 100 « mesh » Merck).

Ils aboutissent à la composition suivante :

acide silicique.....	19 g
amidon d'amioca.....	1 g
silicate de Zinc.....	0,15 g
sulfure de Zinc-Cadmium.....	0,15 g
eau distillée.....	38 à 43 ml

Le silicate de Zinc et le sulfure de Zinc-Cadmium sont des substances fluorescentes déjà proposées par SEASE (1948) en chromatographie sur colonne. Elles ont pour but de rendre plus générale la technique de révélation.

Les poudres bien mélangées sont délayées avec 36 ml d'eau distillée dans un vase cylindrique de 250 ml. La mixture est ensuite portée au bain-marie réglé à 85 °C pendant une minute 3/4, temps nécessaire à l'épaississement du milieu, puis encore 30 secondes. Durant cette opération la masse est soumise à une agitation constante. Après avoir retiré le vase du bain, on ajoute 2 à 7 ml d'eau pour obtenir une pâte fluide que l'on étend sur des lames de verre de 12,7 × 133,3 mm placées entre deux autres plus élevées d'un demi millimètre (épaisseur de couche) et servant de lignes d'appui pour l'opération d'étalement. Les plaques enduites sont ensuite séchées dans une étuve à tirage forcé réglée à 105°. Les couches ainsi obtenues, épaisses d'environ un demi millimètre, présentent un minimum de craquelures et une surface assez dure et unie pour permettre l'écriture au crayon.

Afin de réaliser des chromatogrammes reproductibles, les plaques doivent être amenées à un état de dessiccation à la fois suffisant et bien défini. Pour cela elles sont placées dans un dessiccateur garni d'hydroxyde de potassium et soumises à un vide de 3 mm de mercure ; dans ces conditions opératoires, l'équilibre est atteint en 30 minutes pour les plaques placées encore chaudes dès la sortie de l'étuve.

L'humidité étant très néfaste à l'efficacité des couches, les auteurs remplacent le vide de l'enceinte par un air desséché. Ils sortent alors les plaques et les utilisent dans un délai de 10 minutes une fois exposées à l'atmosphère ambiante.

D'autres auteurs ont apporté par la suite des modifications de détail à ce mode opératoire.

Si dans l'ensemble les proportions d'acide silicique/amidon restent les mêmes, l'origine ou les caractéristiques de chacun de ces deux produits sont variables.

La durée (2 à 3 minutes) et la température de chauffage (85 °C), lors de la gélification du milieu, sont comparables sauf dans la technique de DEMOLE (1958). Cet auteur insiste en effet sur la nécessité de chauffer directement sur le gaz au voisinage de l'ébullition afin d'éviter le craquellement des couches à la dessiccation.

Les proportions d'eau prévues sont équivalentes au stade de la gélification. Elles sont plus élevées en fin d'opération pour REITSEMA (1954) et DEMOLE (1958). Ce dernier auteur préconise un séchage des plaques à la température ambiante avant de les placer à l'étuve. FRYDMAN et coll. (1957 a) expérimentent dans des conditions plus sévères de séchage : 110°-30 minutes, puis une heure sous vide de 0,5-1 mm de mercure en présence de potasse.

Dans certains cas, la nécessité de révéler à l'aide de réactifs agressifs a conduit KIRCHNER et coll. (1951) à supprimer l'amidon comme liant. Ils le remplacent par le plâtre de Paris à la concentration de 20 pour cent. La pâte fluide, obtenue après avoir délayé le mélange avec l'eau, est immédiatement étendue sur les plaques. Celles-ci sont séchées à 75 °C, puis utilisées aussitôt refroidies.

STAHL a utilisé également un gel de silice (Kieselgel G Merck) contenant du plâtre : la poudre de gel de silice est rapidement mélangée dans un mortier avec deux fois son poids d'eau, puis immédiatement étalée sur les plaques.

L'emploi des plaques de grandes dimensions a rendu encore plus impérative la nécessité de réaliser des couches d'épaisseur uniforme, aussi les auteurs ont-ils proposé d'utiliser dans ce but des appareils plus ou moins spécialisés.

Un de ceux-ci a été décrit pour la première fois par MILLER et KIRCHNER (1954).

REITSEMA (1954) a proposé d'utiliser un petit pistolet à peinture.

DEMOLE (1958) s'est servi d'un « appareil à pelliculer » commercial destiné normalement à la production de couches minces de peinture.

Mais, à notre connaissance, deux appareils étudiés spécialement sont, à l'heure actuelle, disponibles sur le marché.

Celui mis au point par E. STAHL (appareil Desaga) consiste essentiellement en une cuve cylindrique allongée dont l'ouverture s'étend sur toute la longueur. Cette cuve pivote autour de son axe à l'intérieur d'un bloc support parallélépipédique. Lors de l'étalement, on introduit la suspension d'adsorbant dans la cuve puis, l'ouverture de celle-ci étant orientée vers le bas, on fait glisser l'appareil dans cette position sur une série de 5 plaques de 200 × 200 mm ou de 20 plaques de 50 × 200 mm.

L'appareil imaginé par MUTTER et coll. (appareil Camag) et

perfectionné par WOLLISH et coll. (1961) est essentiellement constitué par une cuve de section rectangulaire dans laquelle on dépose la suspension d'adsorbant. Deux parois latérales opposées de cette cuve sont mobiles verticalement à la façon d'une trappe. Chacune d'elles repose sur les plaques de verre que l'on fait défiler successivement bout à bout. La « trappe » postérieure, délimite au-dessus des plaques une mince fente dont la hauteur est réglable grâce à 2 vis de surélévation ce qui permet d'obtenir sur les plaques une épaisseur déterminée de pâte. Cet appareil permet d'opérer avec des plaques de 20 ou 10 cm de largeur, la longueur étant au gré de l'utilisateur.

Dépôt des substances

L'humidité atmosphérique ayant une grande incidence sur la valeur des Rf, DEMOLE (1958) a précisé que le dessiccateur contenant les chromatoplaques doit posséder une petite ouverture supérieure afin d'assurer le passage des micropipettes portant les solutions de substances à déposer ; celles-ci doivent être dissoutes dans un solvant volatil peu polaire (pentane, éther, etc.).

KIRCHNER et coll. (loc. cit.) ont attiré aussi l'attention sur la question du solvant des essences. Ils ont en effet remarqué que la dilution dans l'alcool éthylique était responsable de certaines déficiences affectant la qualité des taches tandis que ce phénomène n'était pas observé en se servant de l'hexane comme diluant. Les mêmes auteurs ont constaté également des augmentations de Rf lorsque les prises d'essai sont trop fortes. Ils en attribuent la cause à l'effet de dilution sur le solvant de développement dont les caractéristiques se modifient.

Cependant DEMOLE (1958) a pu chromatographier jusqu'à un milligramme de substance sur des couches suffisamment épaisses (1 mm).

Les prises d'essai varient suivant les auteurs et les conditions opératoires. KIRCHNER et coll. (1951) ont pu déceler des quantités de substance pouvant descendre dans certains cas jusqu'à environ 0,5 microgramme (carvone, aldéhyde cinnamique). STAHL dépose jusqu'à 400 µg de produit.

Développement

KIRCHNER et coll. (1951) ont divisé les solvants en quatre catégories :

1) Ceux qui déplacent les substances vers le front : éthanol, dioxane, éther éthylique, acétone, 1-nitropropane, pyridine, acétate d'éthyle, méthanol.

2) Ceux qui laissent au point de départ la plupart des produits déposés : hexane, éther de pétrole, tétrachlorure de carbone, sulfure de carbone.

3) Ceux qui entraînent les composés étudiés à une distance variable : chloroforme, benzène.

4) Enfin les solvants qui interfèrent dans le test à la fluorescéine : tétrahydrofurane, diacétone alcool, amylène, éthyltriéthoxy silane.

Ces auteurs ont essayé divers mélanges entre les solvants des groupes 1 et 2, ou 1 et 3. Ils ont retenu l'acétate d'éthyle à 15 pour cent dans l'hexane comme un des meilleurs systèmes éluants.

DEMOLE (1958) a préconisé également cette association et signale qu'une proportion de 15 à 25 pour cent d'acétate d'éthyle convient à la séparation des substances oxygénées peu polaires jusqu'aux monophénols. D'après cet auteur, les solvants qui ont des polarités différentes donnent souvent de meilleurs résultats. Toutefois, comme ce type de solvant subit vraisemblablement une chromatographie frontale, il se produit deux fronts d'éluion séparés par un gradient de concentration pouvant lui-même améliorer certaines séparations.

STAHL a remarqué au cours de son étude de nombreuses huiles essentielles, que la durée de développement des chromatogrammes est très variable. Ses recherches lui ont permis d'en attribuer la cause à la dimension des grains d'acide silicique utilisé. Ceux dont la taille dominante est inférieure à 1 μ sont responsables de progressions lentes, par contre les couches à grains grossiers assurent une migration rapide de l'éluant mais sans donner de bonnes séparations.

Les meilleurs résultats sont obtenus pour une granulation répartie principalement entre 1 et 5 μ .

Le même auteur (1959) a remarqué qu'avec un certain nombre de systèmes de solvants on observe, pour un même composé, une augmentation de la valeur de son R_f en allant du centre à la périphérie de la plaque. Cet « effet de bord » serait dû, d'après l'auteur, à un phénomène d'évaporation et pourrait être évité en introduisant contre la paroi interne de la cuve, une feuille de papier filtre imbibée de l'éluant.

STAHL (1962) a aussi appliqué les techniques radiales et par stries angulaires à ses chromatoplaques. Il a pu ainsi obtenir des meilleures séparations.

Révélation (sur les chromatoplaques séchées à l'air).

Sauf mention spéciale, les divers révélateurs cités ont été préconisés par KIRCHNER et coll. (1951).

— *Acide sulfanilique diazoté*, WAGNER (1955) : réactif des phénols comme la para-nitraniline diazotée.

Acides concentrés + aldéhydes (voir aldéhydes).

— *Acide sulfurique concentré* :

Certains composés peu réactifs comme l'eucalyptol peuvent être décelés à l'aide de cet acide.

— *Acide sulfurique — acide nitrique (95 - 5)* :

On fait agir ce réactif à chaud ; on obtient des taches foncées sur fond blanc.

La révélation, à l'aide de ces deux derniers réactifs utilisés en

pulvérisation, n'est valable que sur couche liée au plâtre. Des précautions particulières doivent être prises lors de la manipulation de ces deux liquides corrosifs.

— *Aldéhydes divers et acides concentrés* :

En 1961, avec R. PARIS, nous avons proposé l'utilisation de divers aldéhydes (furfural, vanilline, benzaldéhyde, p-diméthylaminobenzaldéhyde, aldéhyde cinnamique). Ces derniers sont pulvérisés en solution alcoolique acidifiée par l'acide sulfurique. Après action de la chaleur, on obtient des colorations variées.

— *Antimoine (trichlorure d')* à saturation dans le chloroforme (HAYASHI et HASHIMOTO, 1957), (STAHL, 1962), (PARIS et GODON, 1961).

Les couches traitées par ce réactif donnent, après chauffage à l'étuve à 100-110°, des colorations et fluorescences diverses.

— *Antimoine (pentachlorure d')* à 20 pour cent v/v dans le tétrachlorure de carbone (HAYASHI et HASHIMOTO, 1957), (STAHL, 1962).

Après chauffage à 110° ce réactif donne des colorations le plus souvent brun violacé.

— *Brome* (voir fluorescéine-brome).

— *Cadmium* (voir zinc-cadmium).

— *Dianisidine (ortho)*.

Les réactions sensibles décrites pour les aldéhydes par WASICKY et FREHDEN (1937) ont été appliquées avec succès en pulvérisant une solution d'ortho-dianisidine dans l'acide acétique.

— *2-4-dinitrophénylhydrazine* (voir rhodamine 6 G).

— *Fer III (chlorure ferrique)*, DEMOLE (1958).

La solution à 5 pour cent de chlorure ferrique dissous dans le méthanol dilué au demi, permet de détecter certains phénols ou énoles.

— *Fluorescéine-Brome*.

On pulvérise une solution aqueuse de fluorescéinate de sodium à 0,05 pour cent, puis on expose — modérément — la couche aux vapeurs de brome. Celui-ci réagit avec la fluorescéine en donnant de l'éosine. Aux endroits où sont présents des composés à liaisons éthyléniques, le brome se fixe préférentiellement sur celles-ci et l'on obtient alors des taches jaunes sur fond rose.

Les auteurs ont rappelé que la formation d'éosine est empêchée si le milieu est acide ou ne contient pas suffisamment d'eau. Il convient donc dans ce cas de ne pas utiliser l'anhydride phosphorique comme agent de dessiccation des couches¹.

— *Hydroxylamine (chlorhydrate d')* et *chlorure ferrique*, pour la révélation des esters (DEMOLE, 1958).

La réaction à l'hydroxylamine de FEIGL (1956) est reportée sur papier :

1. STAHL (1962) a proposé également de préparer des couches à la fluorescéine en remplaçant l'eau par le même volume d'une solution aqueuse à 0,04 pour cent de fluorescéinate de sodium. Le développement est alors simplement effectué par exposition rapide aux vapeurs de brome.

Les plaques légèrement humidifiées sont recouvertes d'une feuille de papier Whatman n° 1 préalablement imprégnée d'une solution d'hydroxylamine.

Celle-ci est obtenue extemporanément par mélange de volumes égaux d'une solution à 7 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 100 ml d'H₂O et d'une solution à 12 g de potasse pour 100 ml de méthanol.

La feuille de papier étant recouverte d'une plaque de verre, l'assemblage est placé sur une surface légèrement chaude. Après évaporation, les esters se fixent à l'état d'hydroxamates sur le papier. Ces derniers donnent des spots violacés par pulvérisation d'une solution de Fe Cl₃ dans HCl 0,05 N.

Les esters trop peu volatils ne sont pas décelés.

— *p-nitraniline (diazotée)*, RAYBURN et coll. (1953), DEMOLE (1958).

Le réactif est préparé en mélangeant extemporanément :

— 1 volume de solution aqueuse à 0,7 g de paranitroaniline et 9 ml d'acide chlorhydrique concentré pour 100 ml,

— 1 volume de solution de nitrite de sodium à 1 pour cent,

— 2 volumes de solution de carbonate acide de sodium à 5 pour cent.

Après séchage des plaques à 40-50°, les phénols apparaissent à l'état de taches brunâtres ; ceux-ci peuvent être révélés de façon similaire à l'aide de l'acide sulfanilique diazoté (WAGNER, 1955).

— *Permanganate de potassium à 0,25-0,50 pour cent*, (DEMOLE, 1958).

Les plaques sont imprégnées de cette solution pendant 10 secondes, puis immergées dans l'eau courante, les couches siliciques convenablement préparées devant supporter, sans se dissocier, un contact prolongé avec l'eau. Avec les substances insaturées, on obtient des taches brunâtres sur fond blanc.

— *Rhodamine 6 G et dinitrophénylhydrazine*.

REITSEMA (1954) a mis au point un mode de révélation par action de la dinitrophénylhydrazine en solution chlorhydrique (réactif préparé selon BLAND, 1949), sur des chromatoplaques recouvertes d'une couche silicique renfermant de la Rhodamine 6 G pour les rendre fluorescentes aux rayons ultraviolets. Les examens successifs dans le visible et sous U.V. avant et après séjour à l'étuve à 105°, 10 minutes, lui permirent de déceler non seulement de nombreux produits carbonylés, mais aussi d'autres substances déshydratables ou altérables par la chaleur en milieu acide.

— *Zinc-Cadmium (sels fluorescents de)*.

Grâce à la présence dans l'adsorbant d'un mélange fluorescent composé de silicate de zinc et de sulfure de zinc-cadmium (voir précédemment), il est possible de révéler directement certains composés par simple exposition aux rayons ultraviolets de courte longueur d'onde. On obtient ainsi des taches sombres sur fond fluorescent pour la pulégone, la carvone, le p-cymène, l'aldéhyde cinnamique.

III. — CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Si les travaux sur les huiles essentielles sont assez rares, ceux ayant trait à leurs composants sont nombreux et variés.

En ce qui concerne la chromatographie directe des essences, nous n'avons guère à citer que le travail de NOMURA (1953) sur l'essence de Citron chinois (« Natsudaïdai »), ajoutée comme aromatisant à des jus de fruits. Cet auteur a utilisé un papier imprégné d'acide silicique, sans réussir à séparer géraniol, α -terpinéol et linalol.

Quelques auteurs, surtout japonais, ont travaillé sur plusieurs composants possédant des fonctions diverses : HARADA et SAIKI (1956), HAYASHI (1956), KONDO (1957).

Ce dernier auteur a opéré sur un papier traité aux poly-éthylènes (de poids moléculaires 1 000-6 000 et 21 000) et utilise comme solvants mobiles le méthanol additionné de 15 pour cent d'alcool isoamylique ou contenant 10 pour cent de benzène.

Enfin, la majorité des travaux concerne des séries de constituants possédant en commun une même fonction chimique. Aussi avons-nous été conduits à les résumer suivant la classification chimique suivante : hydrocarbures, alcools, produits carbonylés, phénols, peroxydes, acides et esters, coumarines.

Hydrocarbures

Trois publications se rapportent aux composés azuléniques : SCHENCK et FROMMING (essence de Camomille) (1953), KNESSL et VLASTIBOROVA (1954), SYKORA et VOKAC (1960).

Alcools

Les alcools ne sont qu'exceptionnellement chromatographiés à l'état libre (HARADA et SAIKI, 1956), (CASTIGLIONI et PILLERI, 1960).

D'une façon générale ils sont préalablement modifiés en dérivés acides : soit par oxydation simple (FREY et WEGENER, 1957), ou suivie d'une transformation en acides hydroxamiques (THOMPSON, 1951), soit par combinaison avec le sulfure de carbone à l'état d'acides xanthogéniques. Les xanthogénates alcalins ont été étudiés par KARIYONE, HASHIMOTO et KIMURA (1951), POHLOUDEK-FABINI (1957), HOPKINS et BLAKE (1959).

Mais les alcools sont le plus souvent estérifiés en les faisant réagir généralement avec des anhydrides ou des chlorures d'acides :

3-5-dinitrobenzoates : RICE, KELLER et KIRCHNER (1951), MEIGH (1952), CERNY (1955), SUNDT et WINTER (1957), BORECKY, GASPARIC et VECERA (1959).

En 1959, PANAIOTOV et IVANOV ont étudié les alcools de l'essence de Rose à l'aide du système diméthylformamide (phase stationnaire)/décaline (phase mobile). Ils ont révélé aux U.V. les 3-5-dinitrobenzoates des alcools nonylique, éthylique, phénylé-

thylique et méthylique et probablement le géraniol, le nérol et le citronellol.

Phthalates acides : SHICHIJI et HAYASHI (1957).

Dinitrophthalates et Diphénates : SIEGEL et SCHLOGL (1953).

Anthranilates : KARIYONE et HAYASHI (1956).

Aldéhydes et cétones

Les aldéhydes et cétones sont groupés sous la même rubrique, leurs réactions de caractérisation étant souvent communes.

Comme pour les alcools, assez peu de publications se rapportent aux composés carbonylés à l'état libre ; la plus grande partie d'entre elles est relative à la séparation sous forme de 2-4-dinitrophénylhydrazones.

I. — Composés carbonylés à l'état libre

Divers systèmes de développement ont été proposés suivant les cas. Citons entre autres :

INDOVINA et coll. (1955) : vaseline (phase stationnaire)/éthanol - eau - ammoniacque (phase mobile).

GASPARIC et VECERA (1957) : diméthylformamide cyclohexane. Les révélateurs suivants ont été proposés : 2,4-dinitrophénylhydrazine (D.N.P.H.), fuchsine en milieu sulfureux, chlorhydrate de triphényltétrazolium, iodomercurate de potassium en milieu alcalin (SCHULTE et STORP, 1955).

RIGANESIS et CALVARANO (1956) ont étudié selon la technique de INDOVINA et coll. les aldéhydes suivants de l'essence de Mandarine : caprylique, pélargonique, caprique, laurique ; le citral, le citronellal. Les révélations sont effectuées à l'aide de la D.N.P.H. et du réactif de SCHIFF.

SCHULTE et STORP ont étudié l'analyse quantitative d'aldéhydes et cétones par chromatographie sur papier ainsi que son application aux huiles essentielles (1955).

II. — Aldéhydes et cétones

à l'état de 2,4-dinitrophénylhydrazones (Cf LEDERER, 1959)

D'une façon assez générale les révélations sont faites par pulvérisation d'une solution de soude ou de potasse à 10 pour cent.

Quelques auteurs ont opéré sur papier non traité notamment JOPPIEN (1956), CORTINA et MONTES (1954).

Les autres travaux ont été effectués sur papiers imprégnés d'agents divers.

1) CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSÉE

Les papiers utilisés sont imprégnés suivant les auteurs de silico-silices, d'hydrocarbures, d'acétylcellulose (papier acétylé), ou d'huile d'olive.

2) CHROMATOGRAPHIE EN PHASE NON INVERSÉE

Les papiers sont imprégnés d'une substance hydrosoluble (formamide, glycols, etc.), et les phases mobiles sont constituées par un hydrocarbure — ou un mélange d'hydrocarbures — non miscible que l'on sature préalablement de la phase stationnaire :

a) *Papiers imprégnés de formamide ou ses dérivés*

Le formamide est le plus fréquemment employé.

En ce qui concerne les huiles essentielles, PANAIOTOF et coll. ont séparé avec le système diméthylformamide/décaldine, les dinitrophénylhydrazones des produits carbonylés suivants :

— dans l'essence de Rose : acétaldéhyde, propanal, butanal, nonanal, citral, aldéhyde cinnamique et aldéhyde phényléthylque (1958 a, b),

— dans l'essence de Sauge sclérée : aldéhyde caprylique, carvone, pentanal, butanal, propanal, acétaldéhyde, furfural (1958).

PEYRON (1959), a extrait les composés carboxylés de diverses essences, sous forme d'hydrazones de GIRARD et SANDULESCO. Ensuite, il est passé directement aux dinitrophénylhydrazones qu'il a chromatographiées radialement avec le système N-méthylformylaniline/décaldine.

b) *Papiers imprégnés de glycols ou leurs dérivés*

β -phénoxyéthanol : LYNN et coll. (1956), NONAKA et coll (1959); PANAIOTOF et IVANOV (1958 a) ont séparé le citral et la carvone de l'essence de Rose avec le système β -phénoxy éthanol/décaldine.

Propylèneglycol : ELLIS et coll. (1958).

3) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER IMPRÉGNÉ D'ACIDE SILICIQUE

Ces papiers font également intervenir des phénomènes d'adsorption et tiennent, à ce titre, une place spéciale. Ils ont été utilisés par WATANABE et TASAKA (1952), qui ont aussi identifié divers aldéhydes et cétones dans la fraction volatile des feuilles de Mûrier, la phase mobile étant l'éther de pétrole contenant 5 pour cent d'éther éthylique

III. Aldéhydes et Cétones à l'état de combinaisons diverses

SHIMIZU (1954) a chromatographié les bétainylhydrazones des cétones de l'essence de Menthe poivrée et fait observer la difficulté de distinguer la menthone des cétones insaturées comme la pipéritone et la pulégone.

Divers auteurs ont fait appel à d'autres combinaisons telles que : (p-azophényl-phényl) N-semicarbazones, dérivés bisulfiteux ou hydroxamiques, p-nitrophénylhydrazones, semicarbazones, thiosemicarbazones.

Phénols

Le nombre des travaux sur la chromatographie des composés phénoliques des huiles essentielles est assez limité. Ne seront retenues ici que les principales substances à fonction phénol libre des essences officinales (eugénol, thymol, carvacrol), que les auteurs suivants ont notamment étudiées : CHANG et coll. (1952) : eugénol, thymol ; MUHLBERGER (1954) : eugénol ; GREEN et MARCINKIEWICZ (1955) : carvacrol.

LEE et CARUSO (1958) ont extrait les phénols des essences de muscade et de macis. Ils les ont copulés avec l'acide p-diazobenzène sulfonique. Les azoïques formés ont été développés à l'aide du mélange skellysolve C - méthanol - oléate d'éthyle : 94 - 4 - 2. Les auteurs sont parvenus ainsi à distinguer deux essences d'origine géographique différente.

Peroxydes

L'ascaridol, seul peroxyde naturel des essences officinales n'a pas fait l'objet de travaux à notre connaissance.

Acides et esters

Les acides entrant dans la composition des essences peuvent être libres ou estérifiés. Ces deux catégories de composés sont quelquefois étudiées selon des méthodes communes, c'est pourquoi nous les groupons ici.

Séparation des acides à l'état libre :

GULATI et SADGOPAL (1956) ont identifié par chromatographie circulaire les acides de l'essence de la Valériane de l'Inde (*Valeriana Wallichii* D.C.). Les chromatogrammes ont été développés à l'aide du mélange butanol-éthanol-eau : 40 - 10 - 50, et révélés avec le bleu de bromophénol.

Séparation à l'état de dérivés hydroxamiques :

THOMPSON (1951) a transformé en acides hydroxamiques les acides — libres ou obtenus après saponification — de la fraction volatile de la pomme « Granny Smith ». La révélation a été faite à l'aide d'une solution de chlorure ferrique à 10 pour cent.

POHLOUDEK-FABINI et LUTHARDT (1958) ont identifié dans diverses essences, dont celles de Lavande et de Valériane, les esters des acides aliphatiques de C_1 à C_8 ; les acides hydroxamiques obtenus directement à partir de ces esters ont été transformés en sels ferriques, puis chromatographiés (butanol-diméthylformamide-eau : 9 - 1 - 10).

En 1960 les mêmes auteurs ont rendu leur méthode quantitative.

IVANOV, PANAIOTOV, TCHORBADJIAN et BELITCHEVA (1960) ont transformé en acides hydroxamiques les acides libres et estérifiés de

l'essence de Rose. Le solvant employé pour la chromatographie, a été l'alcool isoamylique saturé d'une solution aqueuse d'acide acétique. Les alcools obtenus après saponification ont été chromatographiés à l'état de 3,5-dinitrobenzoates.

Les essences de Crucifères ont été étudiées, en particulier, par KJÆR (1956), puis P. DELAVEAU (1957, 1958, 1961). Ce dernier a obtenu de bonnes séparations avec les thiourées formées par combinaison molécule à molécule d'ammoniac et de divers sénévolés. Solvant mobile : benzène-alcool-eau = 5:2:4. Révélateurs : nitrate d'argent ammoniacal, réactif de GROTE (1931) au nitroprussiate.

Coumarines

Les coumarines ont en général des points d'ébullition élevés et ne sont que très faiblement entraînables à la vapeur d'eau. Aussi les rencontre-t-on surtout dans les essences obtenues par expression comme celles des Citrus.

D'une façon générale, les coumarines sont révélées directement grâce à leur fluorescence en lumière ultraviolette.

RODIGHERO, CAPOALE, RAGAZZI (1952-1953) ont extrait diverses coumarines de *Ruta graveolens* L., des feuilles de *Ficus carica* L. et de l'essence de Citron. Ces coumarines ont été chromatographiées à l'aide des mélanges : méthanol - pyridine - eau (95 - 5 - 5) ou méthanol - phénol - eau (90 - 8 - 2). Les auteurs ont décelé ainsi la présence de bergaptène dans la Rue et dans les feuilles de Figuier, et celle du citroptène dans l'essence de Citron.

STANLEY et VANNIER (1957) ont chromatographié dans l'essence de Citron les coumarines substituées sur papier imprégné d'acide silicique. Cette méthode conjuguée avec l'analyse spectrophotométrique a permis de mettre en évidence l'addition d'essences d'autres Citrus.

Ouvrages à consulter : BLOCK, DURRUM et ZWEIG (1958), LEDERER (1959).

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

INTRODUCTION

Comme le montre l'étude bibliographique qui précède, les méthodes classiques de la chromatographie sur papier se sont révélées inapplicables aux essences elles-mêmes. Le caractère nettement liposoluble de leurs composants empêche en effet tout partage avec la phase stationnaire hydrophile par excellence des papiers habituels.

Par contre, nous avons vu que les techniques d'adsorption sur couche mince et de partage sur papier imprégné se sont montrées utilisables.

Ces deux grands groupes de méthodes se sont tout naturellement offerts à nos recherches, particulièrement la chromatographie sur couche mince d'acide silicique. Mais les techniques sur papier n'étant pas pour autant à négliger, nous avons cherché à étendre leurs possibilités, soit en utilisant de nouveaux agents hydrofugeants, soit en chromatographiant les composés organomercuriques obtenus en mercurisant préalablement les constituants éthyléniques des essences.

Nos travaux personnels comprendront donc les trois chapitres suivants :

Chromatographie sur couche mince, et

Chromatographie sur papiers hydrofugés, des essences non transformées,

Chromatographie sur papier des dérivés mercurisés des essences, suivis de deux autres consacrés respectivement aux

Applications aux essences officinales, et aux

Applications à quelques formes galéniques.

CHAPITRE I

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Principalement destinée à la séparation des substances liposolubles de polarité modérée, la chromatographie sur couche mince ouvre une voie particulièrement fructueuse dans l'étude des huiles essentielles.

La possibilité récente de trouver dans le commerce l'appareillage et les produits spécialement conçus pour la réalisation de cette technique, nous a permis de perfectionner les méthodes étudiées au début de nos essais.

Les généralités sur la chromatographie en couche mince d'acide silicique¹ ainsi que sa mise en pratique ont été traitées dans l'historique et, dès lors, la partie expérimentale sera directement abordée.

Préparation des plaques

Nous avons utilisé des couches d'acide silicique liées soit par un gel d'amidon, soit par le plâtre.

1) Au début de ces recherches nous avons opéré sur des couches liées à l'amidon. La technique de préparation suivante, codifiée au laboratoire de Matière médicale, donne des couches d'aspect régulier (PARIS, 1960, 1961, 1962) :

Dans une capsule en verre Pyrex de 375 ml, on délaye 4 g d'amidon de Maïs dans 200 ml d'eau et l'on porte sur un bain-marie bouillant pendant 6 minutes en remuant.

On ajoute ensuite 50 g d'acide silicique² que l'on incorpore en agitant, la capsule étant toujours sur le bain-marie.

On laisse refroidir, en remuant, jusqu'à environ 45°.

La pâte liquide obtenue est alors étendue à l'aide de l'appareil Camag réglé pour une fente de 1 mm.

Les plaques sont mises à sécher à l'air libre en position horizontale. Elles sont ensuite conservées — pendant un temps limité au maximum à quelques jours — dans un récipient clos garni de gel de silice desséchant. Avant l'utilisation, les plaques sont placées 30 ou mieux 60 minutes à l'étuve 100-105° pour les activer.

On les laisse ensuite refroidir pendant quelques minutes, soit dans un grand dessiccateur contenant un agent desséchant, soit après les avoir recouvertes simplement d'une plaque de verre non enduite, de même format.

Les plaques sont alors prêtes pour le dépôt des gouttes à chromatographier.

1. Également appelé gel de silice.

2. Mallinckrodt « 100 mesh ».

Les couches liées au gel d'amidon sont résistantes et permettent ainsi le marquage au crayon. Elles supportent assez bien l'action de nombreux réactifs, ce qui leur confère des possibilités variées d'utilisation. Toutefois nous leur avons préféré celles liées au plâtre : elles sont beaucoup plus fragiles, mais peuvent subir l'action des réactifs de révélation les plus agressifs ce qui permet de mettre en évidence un plus grand nombre de substances.

2) On trouve aujourd'hui sur le marché des acides siliciques additionnés de plâtre (Camag, Fluka, Merck) et directement utilisables pour la chromatographie en couche mince.¹

Ces adsorbants siliciques ont l'avantage de donner des suspensions sans difficulté et sans chauffage. Il suffit d'en mélanger rapidement une partie avec une quantité d'eau déterminée, voisine de 2 parties. La pâte liquide ainsi obtenue est étendue sans tarder sur les plaques (20 cm × 20 cm ou 10 cm × 20 cm) à l'aide de l'appareil applicateur dont on dispose (actuellement appareils de Camag ou Desaga).

Avec ce type de suspension, le premier de ces appareils doit être réglé pour une fente de 0,3 mm ; le second, ne comportant pas de dispositif de réglage, est directement utilisable.²

Le séchage, l'activation et la conservation des plaques sont pratiqués de la même façon que pour les couches liées à l'amidon.

Les qualités d'acide silicique trouvées dans le commerce ne sont pas toujours d'égale valeur, même d'un lot à l'autre. Ainsi, certains d'entre eux pourront donner des chromatogrammes dont les taches seront à contours moins nets — voire même en comète si la prise d'essai est forte — ou présenteront des positions respectives modifiées, voire inversées. Il convient donc de bien vérifier la valeur d'un acide silicique en l'essayant préalablement à l'aide de mélanges types, ou plus simplement d'essences connues (par exemple 0,5 µl d'essence de girofle laquelle contient une très forte proportion d'eugénol : celui-ci ne devra pas donner de tache en comète).

On retiendra les sortes donnant les meilleures résolutions, même si elles entraînent une durée de développement plus longue.

Dépôt des gouttes

Les substances à chromatographier sont préalablement diluées dans un solvant suffisamment volatil pour assurer un séchage spontané et rapide au moment du dépôt sur les plaques. Toutefois quelques essences deviennent troubles par dilution avec le solvant, soit qu'elles contiennent normalement certains composés insuffisamment solubles, soit qu'elles aient été altérées par oxydation au cours de leur conservation. C'est pourquoi, d'une façon

1. Tout récemment viennent de paraître sur le marché des qualités sans plâtre (Camag, Woelm) et utilisables directement pour la chromatographie en couche mince.

2. L'appareil de STAHL, modifié depuis peu, présente actuellement un dispositif de réglage.

générale, nous avons préféré les diluer dans l'éther éthylique plutôt que dans l'éther de pétrole qui est un moins bon solvant.

Les concentrations utilisées varient entre 0,1 pour cent et 20 pour cent suivant l'importance des prises d'essai à développer, celles-ci étant conditionnées par la sensibilité des réactifs révélateurs ou par le maximum de dépôt pouvant être toléré par la chromatographie elle-même. C'est ainsi que, pour les essences, nous sommes allés jusqu'à des microdépôts de $0,5\ \mu\text{l}$, soit $2,5\ \mu\text{l}$ de dilution à 20 pour cent, afin de pouvoir mettre en évidence certains composants présents en faible proportion.

Les fortes prises d'essai préconisées dans ce dernier cas nous ont incité à déposer directement l'essence sans dilution préalable. Nous avons ainsi utilisé la demi-capacité d'une pipette jaugée à $1\ \mu\text{l}$, et les résultats obtenus ont été aussi bons qu'avec une dilution.

La pureté des substances témoins constitue quelquefois un problème délicat : les composants des essences, en solution ou non, sont en général difficiles à conserver; la rectification, dans la pratique courante du laboratoire, ne permet pas toujours de les isoler à l'état pur. Même dans un composé apparemment pur, des impuretés pourront être mises en évidence sur un chromatogramme, si elles sont révélées par un réactif suffisamment sensible. Aussi avons-nous cherché, dans la mesure des possibilités, à nous entourer de précautions telles que l'usage de réactifs spécifiques et l'observation critique de la tache principale. Certains recoupements fournis par la comparaison avec des essences de composition connue peuvent aussi donner des renseignements utiles.

Le dépôt des gouttes ne pose pas de difficultés particulières avec les couches liées à l'amidon. Il n'en va pas de même pour celles au plâtre dont la friabilité empêche le marquage au crayon. Aussi doit-on, soit marquer préalablement l'emplacement des dépôts à l'aide d'une pointe fine, soit utiliser un gabarit. Celui-ci est généralement constitué par une plaque en matière plastique transparente, présentant une suite de trous ou de dentelures régulièrement espacés, et permettant de guider la micropipette lors de l'application des dépôts. En général, ces derniers sont disposés sur une ligne située à 20-25 mm du bord inférieur de la plaque, et sont espacés entre eux de 10 à 20 mm.

Développement

Comme en chromatographie sur papier, il y a intérêt à varier les milieux de développement. Les solvants suivants, seuls ou en associations binaires ont été étudiés dans ce but : benzène, acétate d'éthyle, éther éthylique, éther isopropylique, hexane, méthylal, méthylchloroforme¹, chlorure de méthylène (dichlorométhane), paraldéhyde, tétrahydrofurane.

1. Qualité stabilisée DOW fournie par la Société Lambert-Rivière.

Après divers essais effectués avec plusieurs huiles essentielles ou leurs composants, nous avons retenu en plus de l'hexane seul et du mélange classique hexane-acétate d'éthyle (10 à 25 pour cent v/v), l'éther isopropylique dilué avec 2 à 10 fois son volume de benzène ou dans 10 à 30 fois son volume de chlorure de méthylène.

L'éther isopropylique employé seul est en général un peu trop éluant, le chlorure de méthylène ne l'est pas assez. Aussi, ces deux solvants ne sont-ils utilisables directement que dans quelques cas particuliers. Le méthylchloroforme, au contraire, peut être employé tel quel, mais il présente l'inconvénient d'une montée bien plus lente que celle des mélanges éluants habituels.

Après évaporation du solvant, lors du dépôt des gouttes, la plaque est introduite avec précaution dans la cuve au fond de laquelle on a déjà versé un volume de solvant mobile tel que la plaque soit immergée sur une hauteur de quelques millimètres. Avec les cuves de verre utilisées, dont les dimensions intérieures sont $9 \times 21 \times 21$ cm ou $5 \times 13 \times 23$ cm, 100 et 50 ml de liquide suffisent respectivement.

La plaque reposant obliquement à l'intérieur de la cuve, et la couche silicique étant orientée vers le bas, on recouvre l'ouverture de son couvercle rodé ou, à défaut, d'un ensemble composé d'une feuille mince de polyéthylène, d'une feuille de matière plastique mousse et d'une plaque de verre. Sur cette dernière, on pose un poids d'environ 1 kg afin de réaliser une étanchéité satisfaisante pendant le développement. La durée de celui-ci varie, notamment, en fonction de l'acide silicique ou des solvants utilisés. Pour une ascension d'une douzaine de centimètres on compte généralement 90 à 120 minutes. Au bout de ce temps on retire la plaque, on la laisse sécher quelques minutes à l'air libre et on procède à la révélation.

Révélation

Avant d'employer les réactifs révélateurs, la chromatoplaque est examinée en lumière de Wood. A cet effet nous utilisons très avantageusement le dispositif de fluorescence de l'électrophotomètre de MEUNIER : ce montage comporte une lampe de type habituel en verre de Wood (Mazda M.A.W. 125 W) à laquelle sont associés un miroir et une lentille. On obtient ainsi un rayonnement plus intense, ce qui permet de mieux distinguer certaines taches faibles que par un examen pratiqué avec la lampe seule.

On entoure les taches d'un trait à l'aide d'une aiguille et l'on note leur couleur et leur intensité.

La plupart des réactifs de révélation ont été cités dans l'histoire et nous indiquerons plus particulièrement ici les réactifs que nous avons utilisés d'une façon courante. Ces réactifs sont pulvérisés à raison de quelques ml par plaque. Pour obtenir les meilleurs résultats, la quantité à utiliser est à déterminer suivant le type de pulvérisateur, et la façon dont on s'en sert. Plus de liquide sera nécessaire si le brouillard est plus fin et émis à une plus grande distance.

On note les taches qui apparaissent à froid, puis on porte à l'étuve à 100-105°, 7 à 8 minutes. Après refroidissement les chromatogrammes sont examinés sans tarder en lumière visible et ultraviolette. Les taches sont entourées comme précédemment à l'aide d'une pointe fine, puis éventuellement décalquées au-dessus d'une chambre à lumière.

Révélateurs utilisés

Vanilline en milieu sulfurique (PARIS et GODON, 1961).

)	Acide sulfurique concentré.....	2 ml
	Solution de vanilline à 1 pour cent p/v dans éthanol à 95°.....Q.S.P.	100 ml

Cet excellent réactif convient à la grande majorité des constituants des huiles essentielles. Il est très sensible et donne, en lumière visible, des colorations le plus souvent bleues (alcools terpéniques et leurs esters, cinéol) quelquefois tirant sur le vert (menthone), ou sur le mauve (carvone, thymol).

Suivant la même formule, peuvent être préparés d'autres liquides révélateurs à base des aldéhydes suivants : benzaldéhyde, aldéhyde cinnamique, p-diméthylaminobenzaldéhyde, furfural (PARIS et GODON, 1961).

Ces réactifs ont également un caractère général et sont utilisables à titre complémentaire.

Trichlorure d'antimoine

On utilise la solution chloroformique saturée qui correspond à environ 25 g de trichlorure d'antimoine pour 100 ml de chloroforme (réactif de CARR et PRICE).

Ce réactif, particulièrement utile en lumière ultra-violette, permet, comme le précédent, de révéler un très grand nombre de composants d'essences, notamment les hydrocarbures éthyléniques.

La couleur des taches est assez variable avec le temps; elles sont souvent rougeâtres ou violacées à la sortie de l'étuve, puis virent peu à peu au gris-brun. En lumière de Wood elles varient en général du bleuté au beige ou jaunâtre. Elles peuvent aussi être rouges ou roses pour certains constituants d'essences.

A noter que la solution chloroformique de trichlorure d'antimoine est corrosive et que des précautions sont nécessaires lors de l'utilisation.

Le pulvérisateur doit être nettoyé à l'acide chlorhydrique après chaque manipulation.

2,4-dinitrophénylhydrazine en milieu sulfurique.

Pour le dosage photométrique des produits carbonylés, PESEZ (1959) a proposé comme réactif une solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine à 0,1 pour cent dans l'acide acétique contenant 0,5 pour cent d'acide chlorhydrique concentré.

Nous avons légèrement modifié cette formule en remplaçant l'acide chlorhydrique par l'acide sulfurique concentré afin d'étendre l'application du réactif à la révélation — à chaud — de substances non carbonylées. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les proportions suivantes :

{ 2,4-dinitrophénylhydrazine.....	0,40 g
{ Acide acétique contenant 0,6 pour cent v/v	
{ d'acide sulfurique concentré....Q.S.P.	100 ml

L'acide acétique présente ici l'avantage sur l'alcool ou l'eau de donner des solutions moins colorées ; le réactif étant utilisé à froid, on peut ainsi améliorer le contraste entre le fond coloré et les taches des composés carbonylés. Celles-ci vont du jaune au rouge orangé. La révélation à chaud (7 à 8 minutes à l'étuve à 100°) fait apparaître d'autres substances comme par exemple les hydrocarbures, les alcools terpéniques et leurs esters. Pour ces composés, les taches sont généralement brunâtres.

Ce réactif, appliqué aux huiles essentielles, permet de révéler sur une même plaque un assez grand nombre de leurs composants.

Toutefois si l'on désire effectuer la révélation à chaud des composés carbonylés en évitant, dans une certaine mesure, celles des autres produits, on utilisera de préférence la formule de PESEZ renforcée comme il suit :

{ 2,4-dinitrophénylhydrazine.....	0,40 g
{ Acide acétique contenant 2 pour cent v/v	
{ d'acide chlorhydrique concentré....Q.S.P.	100 ml

Ortho-dianisidine (O.D.A.) : $\text{CH}_3\text{O} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2) - \text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2) - \text{OCH}_3$ (KIRCHNER et coll., 1951).

Ce composé forme avec les aldéhydes des bases souvent colorées. Nous l'utilisons en solution extemporanée à 3 pour cent dans l'acide acétique. Eventuellement, cette solution peut être purifiée par chauffage en présence de charbon actif, puis filtration (FEIGL, 1956).

Ce réactif est particulièrement sensible pour le citral, les aldéhydes anisique, benzoïque, cinnamique (sensibilité : 0,3 μg), cuminique, la vanilline, le furfural (KIRCHNER et coll., 1951), (FEIGL, 1956).

2,6-dibromo-quinone-4-chloroimine : $\text{O} = \text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 = \text{NCl}$.

La 2,6-dibromoquinone-4-chloroimine se condense en milieu alcalin avec les phénols pour donner des indophénols colorés en bleu.

On pulvérise la solution alcoolique extemporanée à 0,3 pour cent, puis on expose aux vapeurs ammoniacales pendant quelques minutes ou on utilise une solution de carbonate de sodium cristallisé à 10 pour cent.

Les phénols tels que le thymol, le carvacrol, donnent à froid une coloration bleue. Avec l'eugénol, la nuance est plutôt verte.

3-méthyl-2-benzothiazolone hydrazone (M.B.T.H.) :

SAWICKI et coll. (1961) ont décrit une méthode simple et sensible pour la détection et le dosage des aldéhydes aliphatiques. La réaction consiste à faire réagir l'aldéhyde avec la M.B.T.H., puis à transformer l'azine obtenue en un composé de couleur bleue par oxydation à l'aide du chlorure ferrique.

L'application de cette technique est très utile pour déceler la présence de certains aldéhydes contenus en petite quantité dans diverses essences et que l'O.D.A. ne révèle pas d'une façon suffisamment sensible.

On pulvérise une solution aqueuse à 1 pour cent et récemment préparée de M.B.T.H. Après contact d'une minute, on pulvérise la solution de chlorure ferrique à 1 pour cent. Les taches bleues obtenues indiquent la présence d'aldéhydes aliphatiques.

Rhodamine 6G et vapeurs d'iode.

Enfin il paraît utile de proposer une méthode de révélation fondée sur l'extinction de fluorescence par les vapeurs d'iode au niveau des taches à identifier.

Pour rendre fluorescente la couche d'acide silicique, nous avons fait appel à la Rhodamine 6G, colorant déjà utilisé par WHITE et DRYDEN (1948), puis par REITSEMA (1954), pour mettre en évidence sous lumière ultra-violette certaines taches sur les chromatogrammes.

La rhodamine 6G peut être utilisée en solution chloroformique à 10^{-4} p/v, que l'on pulvérise sur les plaques une fois développées, mais il semble le plus souvent préférable de l'incorporer préalablement à l'adsorbant :

Au moment de la préparation des plaques, on mélange 0,05-0,10 ml d'une solution hydroalcoolique de colorant (0,5 pour cent p/v) avec la pâte liquide obtenue avec 15 g d'acide silicique. Les plaques sont ensuite manipulées comme dans les cas habituels. Lors de la révélation, on laisse sécher les plaques venant d'être développées puis, en soufflant dans un tube de verre rempli de cristaux d'iode, on dirige les vapeurs émises sur les chromatogrammes que l'on présente en même temps devant une source de lumière de Wood. Après élimination spontanée de l'excès d'iode, on observe l'apparition de taches sombres sur fond jaune-vert.

Cette technique simple et sensible s'adresse particulièrement aux composés à fonctions éthyléniques pour lesquels l'affinité de l'iode est bien connue, mais elle peut aussi révéler des constituants d'essences comme le thymol, le carvacrol, l'eucalyptol, etc.

L'iode est d'abord absorbé chimiquement par le composé éthylénique, puis physiquement au niveau du dérivé iodé formé. Lors de ce deuxième temps la révélation est positive. L'iode retenu joue un effet de masque vis-à-vis de la substance fluorescente.

Si l'on est en présence d'une tache suffisamment importante, on constate que la première émission de vapeurs engendre une tache claire entourée d'un halo sombre, lequel correspond à une zone moins concentrée en composé éthylénique donc plus rapidement

saturée en iode. En prolongeant l'action de l'iode, on obtient une tache entièrement sombre que l'on peut d'ailleurs observer en lumière visible.

Des agents fluorescents autres que la rhodamine 6G peuvent remplir le même but. C'est ainsi qu'un acide silicique récemment disponible sur le marché renferme un tel produit et peut être utilisé directement à condition, dans ce cas particulier, d'effectuer la révélation à l'aide d'une lampe à rayons ultraviolets de plus courte longueur d'onde (254 m μ avec la lampe Camag).

Cette méthode a l'avantage d'être effectuée à froid sans intervention de réactif liquide. Elle permet de poursuivre la révélation sur la même plaque avec un autre réactif comme la vanilline sulfurique, le trichlorure d'antimoine.

Résultats-discussion

Un travail préliminaire effectué avec le mélange classique hexane-acétate d'éthyle (85:15) a permis de choisir le réactif sulfovanillique comme révélateur général habituel.

L'étude systématique de divers liquides éluants étant ainsi facilitée, les associations suivantes de solvants ont été sélectionnées, comme il a été dit plus haut :

Hexane - acétate d'éthyle.

Chlorure de méthylène - éther isopropylique.

Benzène - éther isopropylique.

Le mélange hexane-acétate d'éthyle (75 - 25) paraît préférable lorsque l'on désire séparer entre eux des alcools terpéniques, tels que citronellol, géraniol ou les citrals a et b.

Les deux groupes d'éluants à base d'éther isopropylique donnent des chromatogrammes au moins aussi nets que ceux obtenus avec le mélange hexane-acétate d'éthyle. Contrairement à celui-ci, ils conviennent particulièrement bien pour séparer le cinéol de l'acétate de linalyle.

Cependant, quelles que soient les diverses phases mobiles binaires étudiées, les taches s'échelonnent généralement dans un ordre comparable ; les inversions de Rf notées pour des mélanges binaires sont rares et ont un caractère limité.

Pour fixer les idées, on observe la série suivante par Rf croissants (fig. 1) : géraniol — citronellol, α -terpinéol, bornéol, menthol, linalol, citral, cinéol, acétate de linalyle, menthofurane, hydrocarbures terpéniques (près du front du solvant).

La séparation de ces derniers est pratiquement effectuée avec un seul solvant : l'hexane.

Etant donné que, dans la chromatographie d'adsorption sur couche mince d'acide silicique, la distance parcourue par le liquide éluant est limitée à 10-14 cm, on peut s'étonner, dans ces conditions, que la séparation des taches soit en règle générale meilleure qu'en chromatographie sur papier. Les taches de Rf très voisins sont souvent bien individualisées alors que dans la méthode de partage sur papier, elles chevauchent fréquemment pour n'en faire qu'une.

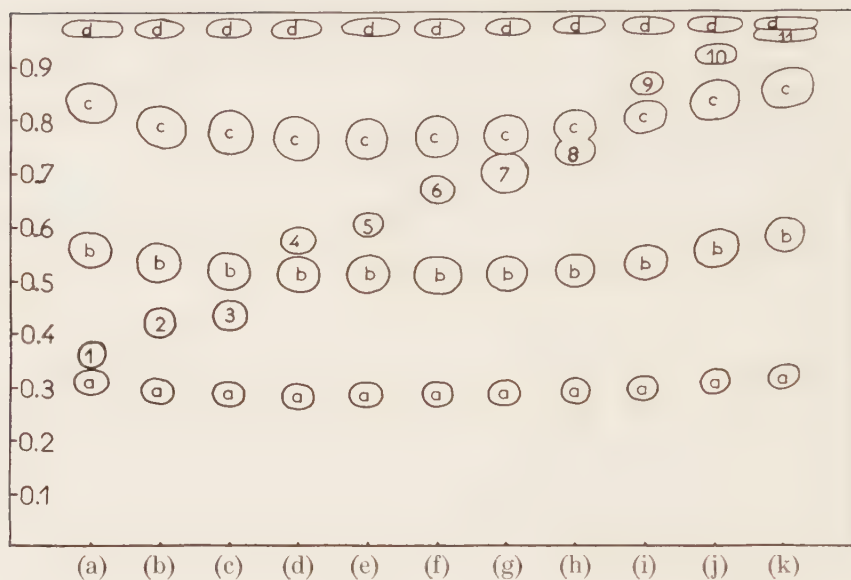


Fig. 1. — Chromatographie sur couche mince d'acide silicique montrant l'effet de bord sur le Rf de quatre substances :

(a) : α -terpinéol.

(c) : Acétate de linalyle.

(b) : Cinéol.

(d) : Gaïazulène.

Noter l'importance du phénomène en fonction du niveau de chacune des quatre séries de taches.

Les autres composants d'huiles essentielles, numérotés de 1 à 11, ont été développés simultanément :

1. Bornéol.

7. Thymol.

2. Menthol.

8. Acétate de terpényle.

3. Linalol.

9. Apiol.

4. Carvone.

10. Salicylate de méthyle.

5. Aldéhyde cinnamique.

11. Anéthol.

6. Eugénol.

Solvant mobile {	Chlorure de méthylène.....	93
	éther isopropylique.....	7

Ainsi dans les chromatogrammes d'essences riches en composants de Rf voisins on peut observer des taches « écrasées » les unes contre les autres sans pourtant qu'elles s'interpénètrent.

Les lois de la chromatographie d'adsorption étant les mêmes sur colonne et sur couche mince, ces constatations peuvent trouver une explication dans l'analyse chromatographique par déplacement. Dans cette technique d'adsorption sur colonne, les substances¹ à séparer se classent et se meuvent en une « procession » sans chevauchement, chacune étant chassée en quelque sorte par les autres substances plus fortement adsorbées et particulièrement par celle qui la précède.

Le phénomène de déplacement est particulièrement net dans certains chromatogrammes et celui effectué avec 0,5 µl d'essence de Cannelle officinale est intéressant à décrire : on distingue facilement la tache de l'aldéhyde cinnamique, massive, un peu allongée longitudinalement et coiffée par une petite tache en croissant correspondant à l'eugénol.

Si l'on compare la tache de l'aldéhyde cinnamique avec celle d'un témoin externe de quelques µg seulement, on remarquera que le niveau inférieur de chacune des deux est sensiblement identique, contrairement à leur niveau supérieur. En d'autres termes, une augmentation de prise d'essai d'aldéhyde cinnamique a pour effet de n'élever seulement que le bord supérieur de sa tache, celle-ci « déplaçant » d'autant celle de l'eugénol.

Il en résulte donc pour ces deux composés une augmentation de Rf, l'une par suite d'une plus forte prise d'essai, l'autre par suite du phénomène de déplacement.

Il conviendra donc de tenir compte avec esprit critique, du Rf des taches situées au-dessus de taches massives ou dans une « procession » de taches pressées les unes contre les autres.

Un autre élément de perturbation réside dans le phénomène de bord ou marginal, et étudié notamment par STAHL (loc. cit.).

Les taches d'une même substance ne sont plus disposées sur une ligne droite mais sur une courbe convexe vers la ligne de départ. On limite ces inconvénients dans une mesure appréciable en opérant sur des grandes plaques (20 × 20 cm), et en retenant plus particulièrement les chromatogrammes voisins de la partie médiane de la plaque. Dans cette zone l'effet de bord est plus limité (fig. 1).

D'autres causes bien connues de variations dans les Rf peuvent intervenir : par exemple le lot d'acide silicique utilisé, l'épaisseur, le degré d'activation ou l'ancienneté de la couche, l'atmosphère ambiante plus ou moins humide, etc.

La chromatographie sur couche mince malgré sa supériorité en de nombreux points, pose plus de problèmes que la chromatographie sur papier classique en ce qui concerne la reproductibilité des Rf ; aussi l'utilisation de témoins internes et externes s'impose-t-elle particulièrement.

1. On devrait plus exactement dire : les solutés de substances.

CHAPITRE II

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIERS HYDROFUGÉS

Toutes les tentatives d'application des techniques classiques de la chromatographie sur papier aux huiles essentielles sont restées vaines. Les constituants des essences sont liposolubles par excellence et ne manifestent par conséquent aucune affinité pour la phase stationnaire hydrophile dont les papiers courants constituent le support. Ils s'étalent plus ou moins au contact des fibres cellulosiques en rejoignant d'emblée le front de la phase mobile. Il ne peut y avoir partage et on ne peut déceler leur présence dans ces conditions.

Les premiers résultats favorables ont été enregistrés grâce aux systèmes de phases inversées. Nous avons en effet déjà signalé (p. 30) que quelques travaux effectués suivant cette technique, avaient permis des séparations de composants d'huiles essentielles. Mais à part certains cas particuliers comme par exemple celui d'aldéhydes (INDOVINA et coll., 1955), les R_f obtenus ainsi sont souvent trop élevés, c'est-à-dire supérieurs à 0,70-0,80 (HARADA et SAIKI 1956), (KONDO, 1957).

La nécessité de traiter préalablement le papier paraissant acquise, nous avons essayé sans grand succès, des agents d'imprégnation tels que formamide, laurylamine, paraffines diverses, stéarate d'alumine. Une solution devait donc être recherchée en s'orientant vers d'autres agents d'imprégnation susceptibles de présenter une plus grande affinité à l'égard des composés terpéniques. Quelques faits d'observation sur les matières plastiques ont ouvert une voie de recherche.

On sait qu'un grand nombre de ces polymères ne sont pas inertes vis-à-vis de solvants organiques à fonction cétonique, ester ou éther oxyde, qui se retrouvent également chez les constituants des huiles essentielles. Or si on laisse ces dernières suffisamment au contact de ces matières plastiques, celles-ci subissent un phénomène de gonflement, se traduisant éventuellement par des déformations et pouvant aller jusqu'à la dissolution.

C'est bien souvent un ester organique qui assure, en tant que plastifiant, la souplesse d'un grand nombre de matières plastiques.

Mais le meilleur exemple est fourni par le celluloid : le camphre, bien connu comme constituant d'huiles essentielles, est ici le meilleur plastifiant de la nitrocellulose au sein de laquelle il perd la plus grande partie de sa volatilité.

Signalons enfin que certaines matières plastiques comme le polystyrène, jouent le rôle de fixateurs vis-à-vis de parfums (BASSIRI, 1959).

L'expérimentation a été entreprise en retenant quelques macropolymères dans chacun des deux grands groupes des cellulosiques et des vinyliques *large sensu*. Les macromolécules tridimensionnelles

ont été écartées d'emblée, étant donné leur grande inertie en présence des solvants organiques. Des considérations déductives et, notamment, certaines analogies de constitution chimique avec le chlorure de polyvinyle, nous ont incité à étudier également d'autres composés comme les paraffines et les diphényles chlorés. Nous verrons que ces dérivés ont donné des séparations se classant parmi les meilleures.

A. — Agents d'hydrofugation utilisés

I. — DÉRIVÉS CELLULOSIQUES

Dans la molécule de cellulose, chaque motif $C_6H_{10}O_5$ ne présente que trois hydroxyles libres. Chacune de ces trois fonctions alcooliques est susceptible de réagir par estérification (nitrates, acétates, etc.) ou éthérification (méthyl- et éthyl-cellulose). Etant donné la longueur de chaîne sur laquelle il est également possible d'agir par dégradation, on peut réaliser une très grande variété de dérivés.

Normalement les chaînes cellulosiques sont groupées en nappes grâce aux forces de cohésion intermoléculaires dont sont principalement responsables les groupes $-OH$ (liaisons hydrogène) et l'on comprend ainsi que la cellulose ne se disperse pas dans l'eau ou la plupart des solvants.

Les forces intermoléculaires se manifestent encore dans les dérivés cellulosiques, mais plus faiblement. Les solvants et plastifiants permettent encore de les diminuer plus ou moins, ce qui explique leurs propriétés solvantes.

(1) *Nitrates de cellulose*

Ils présentent le même aspect que la cellulose. Ils sont solubles dans un grand nombre de solvants organiques et la solubilité dépend essentiellement du degré de nitration,

Les nitrates de cellulose à 11-12 pour cent d'azote, ont les meilleures caractéristiques de solubilité et le plus grand nombre de solvants : acétone, acétate d'éthyle, acétate d'amyle, mélange alcool-éther.

Ils sont insolubles dans les hydrocarbures et leurs dérivés halogénés.

Le mécanisme de la dissolution du nitrate de cellulose a été l'objet de nombreux travaux notamment à l'aide des diagrammes de rayons X. Les conclusions qui en résultent sont importantes à connaître ; elles sont transposables à l'étude de diverses macromolécules de synthèse et permettront de mieux comprendre les mécanismes entrant en jeu dans la chromatographie sur papier hydrofugé dont il sera question plus loin.

Si l'on soumet le nitrate de cellulose à l'action d'un solvant actif tel que l'acétone, les molécules de celle-ci s'insèrent d'abord

entre les chaînes, puis se fixent par combinaison moléculaire (solvation) sur les groupements nitrés latéraux. L'encombrement spatial des molécules d'acétone entraîne l'écartement des chaînes entre elles, de là l'observation du gonflement de la substance.

On remarque donc que la dissolution d'une substance macromoléculaire linéaire, comme le nitrate de cellulose, est précédée par l'absorption — on pourrait dire aussi bien la dissolution — du solvant dans la masse de cette substance. Il en va tout autrement pour une substance cristalline dont la dissolution est caractérisée par la disparition progressive des couches superficielles, venant successivement au contact du liquide et par une limite bien déterminée de la solubilité.

Les composés appartenant au groupe des plastifiants (camphre, phthalate de butyle, etc.), se comportent comme des solvants imparfaits. Lorsqu'ils ont pénétré dans le « réseau », ils se fixent avec plus ou moins d'affinité sur les groupements actifs latéraux des chaînes suivant le processus décrit pour l'acétone. Les combinaisons formées ne sont toutefois pas assez puissantes pour empêcher l'extraction du plastifiant par certains solvants.

Ces considérations font pressentir leur application à la chromatographie de partage des constituants des essences. Ces derniers jouant en quelque sorte le rôle de plastifiant à des degrés variables, on peut prévoir que le solvant mobile les déplacera suivant des R_f variés.

Produit expérimenté : collodion officinal dilué à 10-20-30 pour cent v/v dans l'acétone ou l'acétate d'éthyle.

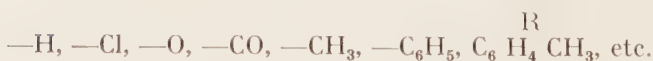
(2) Ethylcellulose

Seuls ont été commercialisés les produits à 43-50 pour cent d'éthoxyle. Ils sont solubles dans de nombreux solvants organiques.

Produit expérimenté : Ethylcellulose (à 48,0-49,5 pour cent d'éthoxyle) à un pour cent p/v dans l'acétate d'éthyle.

II. — POLYMÈRES VINyliques (largo sensu).

Ils résultent de la polymérisation de composés de formule générale $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{R}$. Leurs macromolécules sont constituées par des enchaînements du motif $-\text{CH}_2 - \text{CH}-$, R pouvant être :



Les caractéristiques de solubilité de ces polymères sont variables. Un grand nombre d'entre eux se dissolvent dans une gamme variée d'hydrocarbures, d'esters, de cétones. Le polyacétate de vinyle est également soluble dans le méthanol et l'éthanol. Le polychlorure de vinyle n'est bien dissous que par le tétrahydrofurane et la cyclohexanone.

Polymères étudiés :

Polychlorure de vinyle (57 pour cent de chlore)¹ : solution à 1 pour cent p/v dans la cyclohexanone.

Polychlorure de vinyle surchloré (à 65 pour cent de chlore)² : 2,5 pour cent dans l'acétate d'éthyle.

Polyacétate de vinyle³ : 5 pour cent dans le benzène.

Polyéthylène chlorosulfoné (à 29 pour cent de chlore et 1,25 pour cent de soufre)⁴ : 2,5 pour cent dans le toluène.

Polyméthacrylate de méthyle (qualité soluble dans le « white-spirit ») : 5 pour cent dans le toluène.

Polystyrène⁵ : 2,5 pour cent dans le toluène.

Poly α -méthylstyrène (qualité visqueuse, peu polymérisée)⁶ : 10 et 15 pour cent dans le toluène.

III. — PARAFFINES CHLORÉES ET DIPHÉNYLES CHLORÉS

1) *Paraffines chlorées* : elles résultent de l'action du chlore gazeux sur les paraffines.

Les produits commerciaux peuvent être classés en trois groupes d'après les titres en chlore suivants : 28 pour cent, 42-54 pour cent et 70 pour cent.

Les chaînes contiennent généralement 22 à 25 atomes de carbone (P.M. entre 400 et 1 100).

Les paraffines chlorées se présentent, à la température ordinaire, sous l'aspect de liquides ou masses plus ou moins visqueux (la viscosité augmente avec la teneur en chlore), peu colorés. Vers 70 pour cent de chlore certaines qualités sont solides.

Les paraffines chlorées sont solubles dans les hydrocarbures aromatiques, les solvants chlorés, les cétones, les esters, le cyclohexanol ; la solubilité dans les solvants aliphatiques et l'éther est plus faible pour les qualités à forte teneur en chlore.

Les paraffines chlorées sont stables à la température ambiante mais elles se décomposent par chauffage prolongé au-delà de 100° (libération d'acide chlorhydrique).

La stabilité est en général réduite en présence de certains métaux (fer, zinc, aluminium, étain) ou de leurs sels. Aussi les produits commerciaux sont-ils additionnés d'une faible quantité d'un agent stabilisant (terpènes, dérivés époxy, etc.).

Par ailleurs les paraffines chlorées résistent aux acides et aux alcalis, même à l'acide nitrique chaud.

Produits expérimentés : paraffines chlorées, de titres en chlore voisins de 40-50-70 pour cent p/p, en solution à 10 pour cent p/v dans le toluène.

Ouvrages à consulter : ROBERTS (1949).

2) *Diphényles chlorés* (tétra-, penta-, hexa-)

Ils sont préparés par action du chlore sur le diphényle.

1. Solvic 334; 2. Rhenoflex; 3. Rhodopas BB; 4. Hypalon 30; 5. Afcolène C 100; 6. Dow 276 - V2.

Ce sont des produits visqueux, légèrement teintés de jaune, de très faible tension de vapeur à la température ordinaire.

Ils sont insolubles dans l'eau, peu solubles dans la glycérine, le glycol, solubles dans les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, les esters, les cétones.

Les diphényles chlorés sont inertes vis-à-vis de l'oxygène, des acides, des bases.

Produits employés : diphényles tétra-, penta-, hexachlorés à 10 pour cent p/v dans le toluène.

B. — Imprégnation du papier

Les produits d'imprégnation décrits précédemment ont été choisis en raison de leur solubilité particulière dans les solvants organiques et de leur facile disponibilité sur le marché.

Des papiers ont été imprégnés avec des solutions de chacun d'eux, et de nombreux liquides de développement ont été essayés, en opérant chaque fois avec une gamme de composants variés d'huiles essentielles. Cette expérimentation a permis d'aboutir à des conditions opératoires satisfaisantes.

1) PAPIERS UTILISÉS

Les papiers de faible épaisseur et de texture trop serrée ont été écartés, cela dans les buts respectifs de diminuer la surface du papier relativement à sa masse et de ne pas allonger le temps de développement à cause d'une obstruction trop accusée des interstices du papier par l'agent d'imprégnation. Ainsi a-t-on pensé limiter, dans une certaine mesure, les pertes par volatilité des substances à chromatographier.

Le papier Arches 304 a été utilisé de façon habituelle, en bandes, bandelettes ou rectangles de dimensions variées.

La plupart de ces essais ont été effectués sur des feuilles de 24 × 36 cm et les dépôts des gouttelettes répartis tous les 2 cm sur une ligne de départ située à 2,5 cm du bas de la feuille.

2) PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'IMPRÉGNATION :

En règle assez générale, les solvants cétoniques ont été évités afin de ne pas gêner la révélation des composés carbonylés. On s'est limité à l'utilisation du toluène ou, en cas de solubilité insuffisante dans ce solvant, à l'acétate d'éthyle. Le polychlorure de vinyle a toutefois été dissous dans la cyclohexanone.

La concentration des solutions a été comprise entre 1 et 10 et même quelquefois 15 pour cent p/v. Elle a été choisie de telle sorte qu'elle ne gêne pas l'imprégnation elle-même par excès de viscosité, ou la montée de la phase mobile par suite d'un encombrement trop accentué des pores du papier (pour les titres des solutions, voir plus haut).

Ces solutions sont préparées par agitation intermittente des produits avec les solvants, puis filtration ou centrifugation s'il y a lieu.

Pour le nitrate de cellulose il est plus simple de préparer la solution par dilution du collodion officinal dans l'acétate d'éthyle.

3) TECHNIQUE D'IMPRÉGNATION PROPREMENT DITE

Pour les solutions assez visqueuses (dérivés cellulosiques et polyvinyliques), l'imprégnation a été effectuée par simple immersion des feuilles. Celles-ci sont introduites lentement et sans à-coup dans le liquide, puis retirées avec les mêmes précautions sans prolongation de contact. On les fait ensuite sécher à l'air libre pendant quelques heures en les laissant suspendues à un fil dans la même direction que celle du développement chromatographique prévu. Dans certains cas (polychlorure de vinyle) on pourra compléter cette opération par un séchage à l'étuve à 100°.

Pour les solutions suffisamment fluides, il a paru préférable d'hydrofuger le papier par capillarité selon la technique décrite par SPITERI (1954). Celle-ci est effectuée de la même façon qu'une chromatographie ascendante, en remplaçant le solvant de développement par le liquide d'imprégnation dont on prolonge toutefois l'ascension capillaire quelques centimètres au-delà du front de développement prévu. Le séchage est assuré dans des conditions similaires à celles du premier cas.

Ce deuxième mode paraît préférable ; il nécessite relativement peu de liquide et réalise une répartition plus régulière de la phase stationnaire au sein du papier.

C. — Dépôt des substances

Comme dans la technique des chromatoplaques, les substances sont dissoutes dans l'éther de pétrole ou l'éther éthylique.

Les microdépôts sont effectués à raison de quelques μg à 250 μg de substance suivant la volatilité de celle-ci ou la sensibilité de sa révélation.

D. — Développement

Solvants de développement :

Parmi les nombreux liquides de développement essayés, un petit nombre seulement a été retenu.

L'hexane, le benzène, les hydrocarbures halogénés sont quelquefois utilisables lorsqu'ils ne dissolvent pas la phase stationnaire (hauts polymères), mais ils donnent des R_f trop élevés.

Pour remédier à cet inconvénient, nous avons imaginé d'utiliser une association comportant un liquide organique adjuvant, de très faibles propriétés solvantes. C'est le cas d'un certain nombre de composés fluorés dont l'inertie chimique est caractéristique et parmi lesquels nous avons pu nous procurer un éther cyclique totalement fluoré (E.C.F.), de formule brute $\text{C}_8\text{F}_{16}\text{O}^1$: ce liquide volatil et

1. Nom déposé (Minnesota) : FC75. La formule chimique de ce liquide inerte n'a pas été établie de façon précise, mais on croit qu'il comporte un noyau à 5 ou 6 sommets, avec une chaîne latérale fluorée. L'atome d'oxygène fait partie du noyau.

mobile n'est miscible qu'avec un nombre restreint de solvants. Il peut toutefois être associé, notamment, avec le trichlorotétrafluoroéthylène¹ (T.C.T.F.E.), l'éther iso-propylique, le tétrahydrofuranne. L'expérimentation avec E.C.F. a dû être restreinte vu son prix de revient élevé. Néanmoins en opérant en tubes à essais de large diamètre avec des languettes de papier imprégnées de paraffines chlorées, de bonnes séparations ont été réalisées grâce à l'association de l'éther fluoré avec le T.C.T.F.E. Les chromatogrammes obtenus sont intéressants en ce sens que les taches sont réparties dans un ordre différent de celui constaté avec les systèmes décrits plus loin.

Les liquides de développement préparés avec E.C.F. sont susceptibles de présenter de grands avantages : l'absence d'eau et l'élimination rapide de la phase mobile par évaporation spontanée sont de nature à favoriser la révélation des composants d'huiles essentielles et à en augmenter la sensibilité.

Une solution plus facilement applicable, permettant d'éviter l'entraînement de l'agent d'imprégnation et d'obtenir des taches dont les Rf ne soient pas trop élevés, a été de recourir à des phases mobiles comportant un solvant organique additionné d'eau pour en diminuer le caractère lipophile.

Les solvants suivants, additionnés d'eau, ont donné des résultats positifs : pyridine, méthanol, acide acétique, acétone, tétrahydrofuranne.

L'acidification (CH_3COOH) ou l'alcalinisation (ammoniaque) n'ont pas semblé apporter d'avantages décisifs.

Dans la mesure où les systèmes phase stationnaire/phase mobile ont permis une montée suffisamment rapide (3 à 5 heures), le parcours du liquide de développement a été en général limité à 13-18 cm.

L'expérimentation a été effectuée selon les conditions habituelles de la chromatographie ascendante sur papier à l'aide d'un matériel courant.

E. — Révélation

Excepté les phénols et de nombreux composés carbonylés, la révélation des composants des huiles essentielles constitue un problème difficile en chromatographie sur papier.

Il n'est pas possible de sécher les chromatogrammes après développement, étant donné la volatilité de la grande majorité des substances à identifier.

Il convient donc de pratiquer directement la révélation sur un papier encore imprégné de solvant aqueux.

Les réactifs agressifs — excellents — déjà décrits en chromatographie en couche mince ne sont guère utilisables ici soit que la présence d'eau les rende plus ou moins inefficaces, soit qu'ils soient incompatibles avec la cellulose du papier.

1. Nom déposé (Du Pont de Nemours) : Freon TF.

Force est donc de faire appel à des réactifs moins généraux tels que le permanganate de potassium en milieu alcalin pour les composés éthyléniques — assez nombreux dans les huiles essentielles — l'ortho-dianisidine pour les aldéhydes, la 2-4-dinitrophénylhydrazine pour les composés carbonylés, la 2,6-dibromoquinone chlorimine pour les phénols.

— *Permanganate de potassium*

La réaction proposée par BAEYER en 1888 permet de mettre en évidence les liaisons multiples éthyléniques ou acétyléniques. Elle fait appel à l'action du permanganate de potassium en milieu alcalin. On observe un virage du rose violacé au brun, tandis qu'il se produit une précipitation de bioxyde de manganèse.

Au cours de l'oxydation il se forme des glycols qui peuvent à leur tour être transformés en produits de scission.

Le permanganate est toutefois réduit également par certains composés saturés ou aromatiques tels que les alcools secondaires, le benzaldéhyde, le thymol, le carvacrol, etc. (PESEZ et POIRIER, 1954).

Nous avons utilisé couramment la formule suivante de PACSU, MORA et KENT (1949) :

Permanganate de potassium.....	1 g
Carbonate de sodium.....	2 g
Eau distillée.....Q.S.P.	100 ml

Cette solution de bonne conservation est pulvérisée sur l'une ou les deux faces du papier aussitôt après développement. Au bout de quelques secondes ou quelques minutes de contact, on immerge les feuilles dans un bac rempli d'eau pour éliminer l'excès de KMnO_4 .

Avant l'immersion des feuilles, il convient, par un examen à contre-jour, de repérer à l'aide d'un crayon à bille les taches de faible intensité.

Après élimination de l'excès de KMnO_4 , les taches apparaissent en brun (bioxyde de manganèse).

— *Ortho-dianisidine* (voir formule utilisée en chromatographie sur couche mince, p. 41).

— *2,4-dinitrophénylhydrazine* :

En chromatographie sur papier, il est préférable d'utiliser une formule sans acide sulfurique :

La composition suivante donne satisfaction :

2-4-dinitrophénylhydrazine.....	0,40 g
Acide chlorhydrique concentré.....	2 ml
Acide acétique.....Q.S.P.	100 ml

— *2-6-dibromoquinone chlorimide* :

On pulvérise successivement sur les chromatogrammes la solution alcoolique à 1 pour cent p/v de ce réactif, puis une solution aqueuse de carbonate de sodium hydraté à 10 pour cent.

1. Également appelé 2,6-dibromoquinone-4-chloroimine.

Suivant les phénols étudiés, les taches varient du bleu au violet.

Résultats - discussion

Trois catégories de liquides de développement ont été retenues dans les essais systématiques relatifs à chaque type de papier hydrofugé :

Méthanol — eau : de 30-30 à 70-30.

Acétone — eau : de 30-70 à 65-35.

Tétrahydrofuranne — eau : de 30-70 à 50-50.

Afin d'éprouver la valeur de chacun des systèmes de partage, des chromatographies sur grandes feuilles ont été effectuées avec des séries de substances étalons choisies parmi les composants les plus couramment rencontrés dans les essences (alcools, aldéhydes, cétones terpéniques, etc.).

Parmi les agents d'imprégnation expérimentés, ceux qui ont donné les chromatogrammes les plus nets sont ceux dont le poids moléculaire est le plus faible : diphényles chlorés, paraffines chlorées, polyméthacrylate de méthyle (qualité soluble dans le White spirit), poly- α -méthylstyrène (DÖW 276 —V 2).

Dans l'ensemble, à part quelques variations dans des cas d'espèces, les taches des substances s'échelonnent sur les divers chromatogrammes dans un ordre assez comparable. On peut prendre comme base la série suivante obtenue avec un papier imprégné d'une paraffine chlorée à 50 pour cent de chlore et les solvants de développement suivants : acétone - eau = 40 - 60 et 50 - 50. Par ordre de R_f croissants, on a : acétate de linalyle, safrol, santalol, anéthol, apiol, citral, pulégone, carvone, thymol, citronellol, linalol, aldéhyde cinnamique, géraniol, eugénol, α -terpinéol, vanilline (fig. 2).

Malheureusement, quelques unes de ces substances présentent des R_f voisins et ne pourraient être suffisamment séparées si elles étaient chromatographiées ensemble.

Pour éviter ces difficultés, on modifie, comme il est classique, soit la nature du solvant organique ou sa concentration dans le liquide de développement, soit l'agent d'imprégnation.

Ainsi, pour séparer dans les meilleures conditions les alcools terpéniques cités ci-dessus, on préférera — dans le cas des paraffines chlorées — un solvant acétonique assez riche en eau (40 - 60).

Si l'on désire bien mettre en évidence l'aldéhyde cinnamique et l'eugénol, il conviendra d'adopter un liquide de développement à base de méthanol (par exemple 50 - 50), mais cette fois la position relative de chacun de ces deux composés par rapport aux autres substances sera changée et se trouvera située entre la carvone et le citronellol.

Les taches de l'anéthol et de l'acétate de linalyle sont assez voisines ; l'utilisation d'une paraffine chlorée à 70 pour cent de

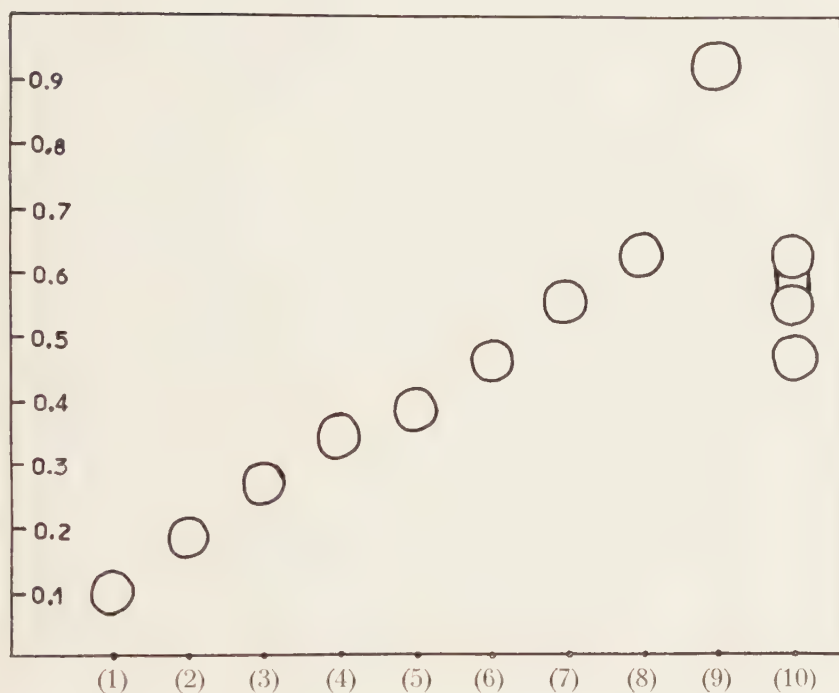


Fig. 2. — Chromatographie sur papier imprégné de paraffine chlorée.

Solvant mobile : acétone-eau = 50:50.

Révélateur : KMnO_4 - Na_2CO_3 .

(1) : acétate de linalyle.

(2) : apiol.

(3) : citral.

(4) : carvone.

(5) : thymol.

(6) : citronellol.

(7) : géraniol.

(8) : α -terpinéol.

(9) : vanilline.

(10) : citronellol + géraniol + α -terpinéol.

chlore et de l'acétone à 60 pour cent comme liquide mobile permettra d'obtenir des taches plus éloignées l'une de l'autre.

Le tétrahydrofuranne, bien que donnant des taches nettes avec les papiers aux paraffines chlorées, est peu intéressant dans ce cas ; la montée de la phase mobile est assez lente et les taches sont trop rapprochées.

L'utilisation de papiers hydrofugés à l'aide d'autres agents que les paraffines chlorées, permet encore de résoudre des séparations restées insuffisantes.

Ainsi avec le système hypalon/acétone - eau = 50 - 50 on séparera mieux l'anéthol de l'apiol.

Le système polystyrène/tétrahydrofuranne — eau = 50 - 50, permettra une meilleure séparation entre le linalol et le citronnellol, entre le safrol et le santalol.

Le système éthylcellulose/tétrahydrofuranne - eau = 40 - 60, fera distinguer le santalol ou le safrol de l'anéthol.

On notera ici que les hauts polymères ne sont pas à négliger, bien qu'ils ne puissent être utilisés d'une façon générale. Avec eux les chromatogrammes montrent souvent des taches plus diffuses, plus allongées — des traînées même — et de plus faible intensité, les constituants chromatographiés étant insuffisamment retenus par la phase fixe.

Ces observations conduisent à constater en quelque sorte une certaine « capacité de partage » pour un système donné. Avec les hauts polymères, elle est très abaissée alors qu'elle est élevée avec des agents hydrofugeants comme les paraffines chlorées, qui tolèrent des dépôts plus massifs de substances à chromatographier.

Les mécanismes entrant en jeu dans la chromatographie sur papier des constituants des huiles essentielles sont conditionnés par l'agent d'imprégnation du papier, la phase mobile et la nature des substances à chromatographier.

1. — AGENTS D'IMPRÉGNATION

Seront pris en considération leur nature chimique, leur poids moléculaire et la quantité déposée au sein du papier.

Prenons l'exemple du polychlorure de vinyle qui est en quelque sorte un polyéthylène dont un atome de carbone sur deux présente un atome d'hydrogène substitué par un atome de chlore. Ces derniers constituent des centres d'attraction pour les molécules polaires à chromatographier. Il en résulte qu'une phase stationnaire constituée par du polychlorure de vinyle aura une plus grande affinité pour les composés à chromatographier que les polyéthylènes, dont les chaînes paraffiniques ne portent aucun pôle d'attraction.

Ainsi n'est-il pas étonnant que les Rf obtenus aient des valeurs plus faibles — et par là même plus utilisables — avec le polychlorure de vinyle, qu'avec le polyéthylène (KONDO, loc. cit.) ou la paraffine (HARADA et SAIKI, loc. cit.).

Le même raisonnement s'applique également aux autres chaînes macromoléculaires contenant des groupements actifs : nitro, éthoxyle, acétyle, phényle, etc.

La solubilité des plastomères dans les solvants organiques, c'est-à-dire également dans les composants des huiles essentielles, croît au fur et à mesure de la diminution de la longueur de la chaîne. Il y a donc intérêt à choisir des produits à faible, ou très faible degré de polymérisation. C'est ainsi que de meilleurs chromatogrammes ont été obtenus avec le poly- α -méthylstyrène (DOW 276-V2), le polyméthacrylate de méthyle (voir p. 49), qu'avec les hauts polymères tels que nitrate de cellulose, polychlorure de vinyle, etc.

Quant aux paraffines chlorées que l'on peut assimiler grossièrement à un polychlorure de vinyle de courte chaîne, elles sont très solubles dans les divers solvants organiques et l'on comprend qu'elles donnent d'excellentes chromatographies.

Parmi les composés de faible poids moléculaire, il était intéressant d'étudier des molécules de structure différente des chaînes aliphatiques. Une expérimentation conduite, dans les mêmes conditions opératoires, avec les tétra- penta- et hexa-chlorodiphényles, a aussi bien réussi qu'avec les paraffines chlorées ; les chromatogrammes obtenus à l'aide du méthanol aqueux (50 pour cent v/v) sont toutefois meilleurs pour les dérivés penta et hexa, ce qui confirme à nouveau l'importance des substitutions par des groupes actifs.

Ajoutons que les diphényles chlorés possèdent l'avantage d'être des espèces chimiques définies contrairement aux polymères de synthèse et paraffines chlorées.

Une autre supériorité non négligeable des agents d'imprégnation présentant des groupements actifs, relativement à ceux non polaires, est qu'ils sont souvent plus facilement mouillables par les solvants mobiles ce qui assure un développement plus rapide.

Mais la présence des groupements actifs n'est pas une condition suffisante de réussite.

Des essais d'imprégnation de papier effectués avec le γ -hexachlorocyclohexane pur cristallisé ont abouti à des échecs, explicables d'ailleurs. En effet, les substances de nature cristalline ne se laissent pas pénétrer dans leur masse par les molécules de solvants (les constituants des huiles essentielles doivent être considérés ici comme des solvants), lors de l'opération de dissolution. On se trouve pratiquement dans ce cas en présence de phénomènes de surface, donc d'adsorption et les capacités d'échange entre phases sont limitées.

Des essais entrepris avec des paraffines chlorées solides à haute teneur en chlore (70 pour cent) ont également donné lieu à des échecs, vraisemblablement pour les mêmes raisons.

En ce qui concerne le *degré d'imprégnation*, trois séries d'expériences sur papier traité au collodion officinal ont été effectuées en prenant l'anéthol comme substance de référence (microdépôts de 40 μ g). On a fait croître le degré d'imprégnation en nitrate de cellulose de la première à la troisième série, en utilisant des dilutions acétoniques de collodion, respectivement à 10 - 20 - 33 pour cent v/v. Chacune des trois séries a comporté quatre chromato-

graphiques, avec la gradation suivante dans les solvants mobiles (fig. 3) :

	(1)	(2)	(3)	(4)
Tétrahydrofuranne.....	30 ml	35	40	45
Eau distillée.....	70 ml	65	60	55

Le parcours des phases mobiles (1) à (4) a été limité à 10 cm (développement : 2 heures).

Les résultats obtenus ont permis de vérifier qu'à concentrations de tétrahydrofuranne égales, l'augmentation de la densité d'imprégnation en agent hydrofugeant entraîne la diminution des Rf, en même temps qu'une plus grande netteté des taches. Celle-ci est aussi tributaire du degré de volatilité de la substance à déterminer. Mais cette volatilité peut être considérablement diminuée si l'agent d'imprégnation est convenablement choisi (cf camphre dans le celluloid) et s'il se trouve dans un état « activé » comme on le verra ci-après, grâce à l'action du ou des solvants organiques composant la phase mobile.

2. — PHASE MOBILE

Dans l'expérience précédente sur papier au collodion, on a constaté que, pour une même série d'expériences, les taches les plus nettes et les plus condensées correspondent aux systèmes éluants les plus riches en tétrahydrofuranne.

Ces faits signifient que l'augmentation de la concentration en cette substance va dans le sens d'un gonflement plus accentué du nitrate de cellulose. Il s'ensuit, au contact de celui-ci, une pénétration et une affinité plus marquées des molécules à chromatographier. Le solvant remplit donc deux rôles : celui de véhicule dans la phase mobile et celui d'activateur¹ du polymère au niveau de la phase stationnaire. Les Rf sont toutefois augmentés ici par suite de l'action prédominante d'un milieu mobile plus riche en solvant organique.

Si le solvant entrant dans la composition de l'éluant est trop peu gélatinisant vis-à-vis de l'agent d'hydrofugation, les taches obtenues auront des Rf plus élevés et pourront même prendre l'aspect de traînées, ou disparaître. On cherchera alors un solvant ayant plus d'affinité pour le polymère choisi dont on imprégnera plus fortement le papier si cela est encore possible. Ainsi pour les papiers au polychlorure de vinyle on constate que les milieux de développement à base de méthanol et même d'acétone doivent être abandonnés au profit de ceux au tétrahydrofuranne².

1. L'activation pourrait également être réalisée en faisant appel à un polymère préalablement additionné d'un solvant plastifiant, soit encore en équilibrant le papier hydrofugé en présence de vapeurs du solvant actif.

2. Par contre une poudre fine de polychlorure de vinyle (Solvic 334) employée en chromatographie sur couche mince avec le méthanol aqueux phase mobile donnera des taches nettes.

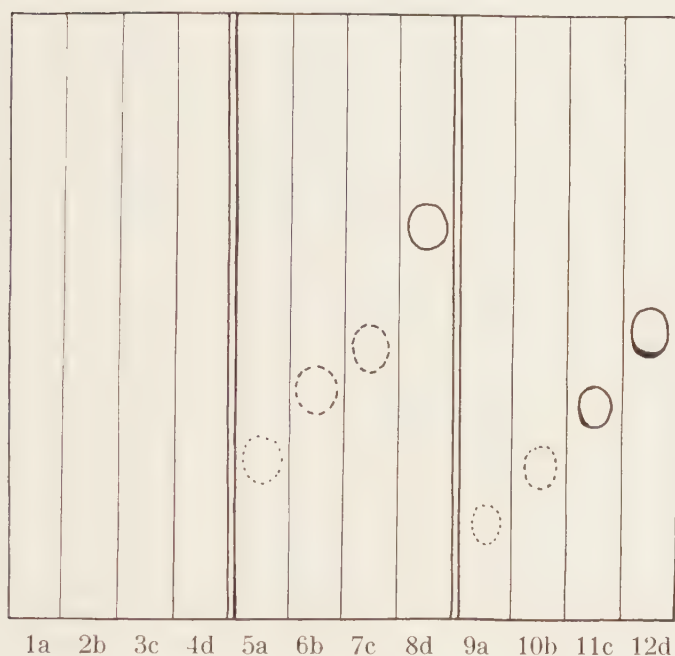


Fig. 3. — Influence de la concentration en agent hydrofugeant (phase stationnaire) et de celle en solvant actif (phase mobile).

Chromatographies sur papiers imprégnés de collodion :

Microdépôts de 40 μ g d'anéthol.

Révélation : KMnO_4 — Na_2CO_3 .

Liquides d'imprégnation:

1 - 2 - 3 - 4	:	collodion officinal dilué au 1/10.
5 - 6 - 7 - 8	:	— — — 1/5.
9 - 10 - 11 - 12	:	— — — 1/3.

Solvants mobiles:

a:	tétrahydrofurane à 30 pour cent v/v.
b:	— 35 — — —
c:	— 40 — — —
d:	— 45 — — —

Aucune tache n'est visible en 1-2-3-4.

3 — ROLE JOUÉ PAR LES SUBSTANCES A CHROMATOGRAPHIER

Les diverses substances appartenant au groupe des huiles essentielles ne se comportent pas toutes aussi favorablement les unes que les autres lorsqu'on les chromatographie. Il vient d'être signalé plus haut que les systèmes de partage à hauts polymères ne rendaient possible la chromatographie que pour un nombre limité de substances alors qu'avec les paraffines chlorées, de telles difficultés n'ont pas lieu. On notera cependant, dans ce dernier cas, que le linalol a tendance à donner des taches plus diffuses, alors que celles de Rf voisins (géraniol, citronellol) sont nettes.

A ces exemples on peut ajouter le cas des hydrocarbures terpéniques dont la présence n'est pas, en général, révélée quels que soient les systèmes étudiés. Si, par exemple, on effectue des chromatographies de limonène à l'aide du système de partage paraffine chlorée/acétone à 65 pour cent, avec le permanganate de potassium comme révélateur, on peut observer qu'une migration de l'hydrocarbure a effectivement lieu dans les premières minutes du développement. Mais la tache obtenue ne tarde pas à s'étaler pour devenir invisible. Le fait que les hydrocarbures n'ont pas de groupements actifs, apporte ici une explication car on se trouve alors dans le cas inverse de celui de la chromatographie de constituants polaires d'huiles essentielles sur papier imprégné de paraffine ou de polyéthylène. Cependant des hydrocarbures sesquiterpéniques comme le caryophyllène ou l'azulène peuvent être chromatographiés, sans doute grâce à leur P.M. plus élevé qui les rend moins volatils.

La grandeur de la prise d'essai n'est pas sans incidence sur la forme et le Rf des taches. Ici le phénomène est inverse de celui observé en chromatographie sur couche mince. Pour des dépôts fortement augmentés, on note une extension de la tache en direction du point de départ, le bord supérieur restant au même niveau. Plus rarement (apiol) et surtout avec des milieux moins riches en solvant actif, l'augmentation de la prise d'essai entraîne un retard de migration de la tache entière. Peut-être, la substance, du fait de sa grande concentration locale, joue-t-elle, à la façon du solvant actif, un rôle auto-activant sur la phase stationnaire.

Mais si le Rf d'une substance est abaissé par suite de l'augmentation de la prise d'essai, ce fait peut aussi entraîner l'abaissement de Rf d'une autre substance. Ainsi dans le chromatogramme de l'essence de Cannelle qui sera décrit plus loin on remarquera que l'eugénol a un Rf un peu plus bas que celui d'un témoin externe de même valeur. Ici encore on pourrait invoquer, avec plus de netteté d'ailleurs que précédemment, un phénomène d'auto-activation dû à la forte proportion d'aldéhyde cinnamique.

Enfin, il convient de rappeler que les Rf obtenus sur papiers hydrofugés sont d'une façon générale beaucoup moins constants qu'en chromatographie classique. Il est encore plus nécessaire de faire usage de témoins externes et internes.

En conclusion de ces essais, les hauts polymères — considérés sans substance adjuvante, telle qu'un plastifiant par exemple — ne peuvent être employés comme agent d'hydrofugation que dans des cas particuliers.

Pour l'analyse courante, peuvent être retenues les substances *amorphes*, peu polymérisées (telles que poly- α -méthylstyrène, polyméthacrylate de méthyle, etc.) ou dont les poids moléculaires sont relativement assez faibles : paraffines chlorées, penta- et hexachlorodiphényles.

Les solvants les plus utilisables sont l'acétone, le méthanol et le tétrahydrofurane aqueux.

CHAPITRE III

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER APRÈS MERCURISATION

Généralités

En ce qui concerne les hydrocarbures, on a pu remarquer dans les études précédentes que la grande majorité de ces composés passe inaperçue en chromatographie sur papier et que les possibilités de choix de phases mobiles sont restreintes en chromatographie sur couche mince.

Aussi pour compléter ces techniques, il a été jugé utile de s'orienter dans une voie différente, en prenant comme base non la chromatographie directe des composants mêmes des essences, mais celle de dérivés obtenus après action préalable d'un réactif spécifique.

Dans cet esprit, des auteurs cités au début de ce travail ont déjà mis à profit les diverses fonctions organiques rencontrées dans les composants des huiles essentielles.

Mais il restait la fonction éthylénique dont les propriétés n'avaient pas été exploitées malgré l'importance privilégiée que lui vaut sa présence dans la majorité des composants des essences. La liaison éthylénique est en effet souvent présente dans les diverses catégories de constituants qui entrent dans leur composition, à savoir alcools, aldéhydes, cétones, éthers, esters, hydrocarbures. Dans ce dernier cas, elle est particulièrement précieuse, puisqu'elle reste la seule possibilité pratique de transformer la molécule qui la contient.

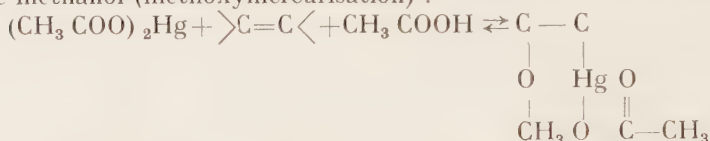
Le choix de cette fonction paraissait donc s'imposer en ce qui concerne les hydrocarbures.

Parmi les nombreuses possibilités de réactions chimiques offertes par la liaison éthylénique, notre attention a surtout été retenue par la propriété de former, avec les sels mercuriques, des

composés d'addition dont la chimie a été exposée en détail par CHATT (1951).

Le mode de formation de ces composés est variable suivant la nature du sel mercurique et celle du solvant dans lequel s'effectue la réaction (eau, méthanol, acide acétique, etc.).

On admet habituellement le processus réactionnel suivant dans le méthanol (méthoxymércurisation) :



La réaction décrite ci-dessus est représentée selon un mode d'écriture arbitraire qui ne préjuge en rien du mécanisme réel de combinaison.

Des réactions, autres que celles d'addition, peuvent aussi avoir lieu. Elles dépendent de la nature du composé éthylénique et des conditions de réactions. Il pourra se former des complexes de coordination, des composés de substitution, des produits d'oxydation tels que glycols, composés diméthoxylés (BIRKS et WRIGHT, 1940) et carbonylés, des polymères ou des dérivés cycliques.

Mais c'est dans le méthanol que la fixation des sels mercuriques s'effectue le plus facilement et le plus souvent sans réaction secondaire ; aussi dans ce solvant, les rendements sont-ils les meilleurs.

Pratiquement, l'acétate mercurique est le sel le plus aisément utilisable pour la préparation de ces composés d'addition ; dans ce cas, la réaction inverse est négligeable et il n'est pas indispensable d'ajouter un alcali pour la supprimer.

En dernière analyse, nous avons donc choisi la technique utilisant l'acétate mercurique en milieu méthanolique.

Ces réactions peuvent être accélérées par l'emploi de catalyseurs, l'acide nitrique par exemple. Cet acide est remplaçable par le nitrate de sodium à saturation dans le méthanol si l'on opère dans ce solvant.

Le facteur température est à prendre en considération car il affecte la pureté des produits obtenus. Ainsi, au-dessus de la température ordinaire, il peut se produire des réactions secondaires et en particulier, des oxydations au cours desquelles Hg^{++} passe à l'état Hg^+ .

L'effet de la concentration n'est pas aussi marqué, sauf en cas d'augmentation de la température.

Malgré leur fragilité en présence d'acides halogénés, ces composés d'addition sont généralement assez stables, notamment vis-à-vis de l'eau et de l'oxygène de l'air.

Applications analytiques

Les réactions avec l'acétate mercurique ont été mises à profit dans la détermination quantitative de certaines liaisons éthyléniques. Dans ce domaine, MITCHELL (1956) a passé en revue les

méthodes proposées par les auteurs suivants : MARQUARDT et LUCE (1949, 1950), MARTIN (1949), DAS (1954). Les résultats obtenus avec divers composés ont été également rassemblés et permettent d'apprécier les limites d'application de la méthoxymécurisation.

SPENGLER (1956) a étudié la cinétique de la réaction avec diverses oléfines isomères (hexènes, nonènes). Les rendements s'échelonnent dans l'ensemble entre 50 et 100 pour cent pour un temps de contact de 32 minutes.

De tous ces travaux, on peut conclure que la méthoxymécurisation donne de très bons rendements avec les composés éthyléniques contenant une double liaison terminale ou une double liaison interne présentant l'isomérisie *cis*, exemple : le cyclohexène. Les esters insaturés ne réagissent pas quantitativement, et il est à présumer qu'il en est de même avec les aldéhydes et les cétones α - β insaturés (MITCHELL, 1956).

Ayant décrit les principaux aspects de la méthoxymécurisation, nous sommes en mesure d'en apprécier l'intérêt en vue de son application à la chromatographie sur papier et dès lors, nous aborderons la partie expérimentale proprement dite.

Partie expérimentale

Etant donné sa simplicité, nous avons choisi la technique de MARQUARDT et LUCE, laquelle utilise le méthanol comme unique solvant ; les modifications de détail apportées ne concernent que les concentrations en présence.

Afin de diminuer les risques de réactions secondaires, on opère à la température ordinaire.

L'étude d'une huile essentielle constituant souvent un cas particulier, il convient de rechercher, pour chacune, les conditions optimales de mécurisation qui permettent de réaliser les chromatogrammes les plus nets et les plus caractéristiques. La préparation d'une gamme dans laquelle les proportions d'acétate mercurique vont en croissant, permet de trouver ces conditions.

La technique suivante peut être proposée (éventuellement avec des variantes) :

Disposer une série de 8 petits tubes de 12/60 mm et introduire successivement dans chacun d'eux les quantités suivantes en ml, en agitant après chaque addition :

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Méthanol.....	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	—	—	—
Solution 0,1 M d'acétate mercurique ¹ dans le méthanol	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1	1,50	2
Essence.....	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

1. Formule du réactif	Acétate mercurique pur.....	3,20 g
	Acide acétique cristallisable.....	0,16 ml
	Méthanol pur.....	Q.S.P. 100 ml

Laisser en contact 1 à 2 heures à la température ambiante.

Le contenu de chaque tube ainsi préparé est prêt pour la chromatographie.

Dans les derniers tubes il reste un excès d'acétate mercurique n'ayant pas réagi. Cet excès donne sur les chromatogrammes une tache en général bien séparée près du front du solvant.

On peut juger utile de supprimer cet excès pour éliminer l'interférence possible de la tache mercurique avec celle d'un composé organo-mercurique. Pour cela, il suffit d'ajouter dans chaque tube une petite pincée d'acide ascorbique ou mieux d'ascorbate de sodium. On agite pendant 2 ou 3 minutes. Le sel mercurique précipite à l'état mercurieux. On laisse déposer, ou on centrifuge, puis on procède au dépôt des gouttes. L'expérience a montré que cette opération n'a pratiquement aucune répercussion sur la qualité des chromatogrammes que nous avons examinés, ce qui montre que les composés organo-mercuriques présents sont respectés ou, du moins, n'ont pas été détruits en proportion appréciable.

Imprégnation du papier

Les premiers essais, effectués sur papier normal, se sont montrés infructueux, le R_f des taches étant trop voisin de l'unité, ce qui signifie que les composés organo-mercuriques formés sont encore très liposolubles.

Il s'est donc avéré nécessaire d'opérer avec des papiers imprégnés.

Les produits d'imprégnation suivants ont été écartés parce qu'ils donnaient des taches trop allongées ou de R_f trop élevé, ou encore des traînées :

— paraffine, huile de paraffine, perhydrosqualène, méthyl-naphtalène ;

— polystyrène, poly- α -méthylstyrène, polychlorure de vinyle, polychlorure de vinyle chloré, polychlorure de vinyle sulfoné ;

— paraffines chlorées, diphenyles chlorés.

— nitrobenzène, nitronaphtalène.

Les résultats ont été favorables avec l' α -chloronaphtalène et l' α -bromonaphtalène. L'expérimentation a porté presque exclusivement sur ce dernier dont la volatilité est moindre et dont nous avons obtenu plus facilement la qualité pure sur le marché.

Ce dérivé naphtalénique est utilisé à la concentration de 15 pour cent v/v dans le toluène. La technique d'imprégnation du papier (Arches 301) est identique à celle décrite précédemment pour la chromatographie des essences non modifiées. Pour des raisons semblables, la montée capillaire a été préférée à la simple immersion. Deux ou trois heures de séchage à l'air libre suffisent ensuite avant l'utilisation.

Le formamide a permis également de réaliser de bonnes séparations. Il est dissous extemporanément à raison de 25 pour cent v/v dans l'acétone et la technique d'imprégnation reste la même. Le séchage a lieu à l'air libre pendant quelques minutes.

Dépôt des gouttes

Il est effectué après mercurisation à partir des solutions méthanoliques telles quelles ou, éventuellement, après traitement par l'ascorbate de sodium.

La quantité déposée sur le papier est habituellement de un à quatre microlitres.

Le séchage de chaque microlitre déposé a lieu à la température ambiante sans ventilation. Il demande trois à cinq minutes.

Solvants mobiles

De l'essai de divers systèmes, il apparaît que le solvant mobile doit présenter une réaction alcaline. Les composés organo-mercuriques passent ainsi à l'état d'hydroxydes fort peu ionisés et, de ce fait, se prêtent mieux à l'obtention de taches sans élongation (cf travaux de MACHEBOEUF et MUNIER sur les alcaloïdes).

Les divers agents alcalinisants suivants ont été essayés : hydroxydes d'ammoniums quaternaires, ammoniacque, amines diverses (diéthylamine, triéthylamine, n-propylamine, iso-propylamine, n-butylamine, isobutylamine, diphenylamine).

Les hydroxydes d'ammoniums quaternaires, très dissociés, ont été écartés en raison de leur action destructrice, soit sur les systèmes solvants, soit sur les produits à chromatographier.

Inversement, les amines aromatiques sont trop faiblement dissociées pour produire la double décomposition.

L'ammoniacque peut seulement être utilisée dans les milieux suffisamment hydrophiles, aussi l'isopropylamine a-t-elle été choisie, car elle convient également aux solvants mobiles hydrophobes ; sa constitution chimique permet d'espérer un minimum d'interférences. Une faible concentration paraît préférable.

Suivant que l'on emploie les papiers à l' α -bromonaphtalène ou au formamide, les solvants utilisés dans la préparation du liquide mobile devront être additionnés d'eau ou non, de façon à éviter l'entraînement de la phase stationnaire. Ils seront choisis hydrophiles dans le premier cas, et hydrophobes dans le second.

— Papiers imprégnés d' α -bromonaphtalène

Les solvants suivants ont été essayés soit purs, soit associés entre eux : méthanol, éthanol, isopropanol, N-butanol, tétrahydrofuranne, acétone.

Le méthanol permet des développements dont la durée est plus courte relativement aux autres alcools, mais les taches obtenues sont plus diffuses.

Avec le tétrahydrofuranne, les R_f sont, dans l'ensemble, assez élevés.

L'acétone a donné les meilleures séparations avec les taches les moins diffuses.

Le liquide mobile suivant a été presque exclusivement utilisé :

Acétone.....	60 ml
α -bromonaphtalène...	Q.S.P. saturation (pratiquement 1,20 ml si l'on opère à 20°)
Isopropylamine.....	0,50 ml
Eau distillée...	Q.S.P. 100 ml

— *Papiers imprégnés de formamide*

Les possibilités paraissent ici plus larges. D'une manière générale, la phase mobile comprend un hydrocarbure aliphatique ou aromatique que l'on additionne d'isopropylamine et au besoin d'une quantité variable de chloroforme suivant les grandeurs de Rf que l'on désire obtenir. Dans tous les cas, le milieu doit être saturé de formamide.

Soit donc la formule suivante :

Isopropylamine.....	0,50 ml
Chloroforme.....	0 à 99,50 pour cent v/v
Hydrocarbure (hexane, cyclohexane, décane, benzène, tétraline).....	Q.S.P. 100 ml
Formamide.....	Q.S.P. saturation.

Développement

Le problème de la volatilité des composés à chromatographier n'est pas à craindre ici et l'on peut opérer par la méthode descendante si on le désire. La technique ascendante a été adoptée ici pour des raisons de commodité.

Nous avons opéré couramment selon les conditions décrites lors de la chromatographie directe des essences. Le développement a été effectué dans des cuves cylindriques de 16 cm de diamètre sur 26 cm de hauteur, avec des feuilles de 24×36 cm enroulées en cylindre et imprégnées par voie capillaire.

Avec le système α -bromonaphtalène/acétone à 60 pour cent, la durée du développement est d'environ 11 heures, pour un parcours de 20 cm.

Avec les systèmes au formamide, le développement est beaucoup plus court et ne demande qu'une à trois heures suivant les phases mobiles utilisées.

Dans tous les cas il importe, selon la règle générale, de pratiquer la chromatographie dans une pièce dont la température est constante et uniforme, de préférence voisine de 20 °C.

Pratiquement nous obtenons de bons résultats en entourant la cuve d'un manchon cylindrique isolant.

Révélation

Lorsque la phase mobile a parcouru 18 à 20 cm, on repère le front et, sans laisser sécher la feuille, on pulvérise sur les deux faces de celle-ci une solution de diphénylcarbazone à 0,25 pour cent p/v dans l'alcool à 95°.

La diphenylcarbazone est un réactif extrêmement sensible non seulement des ions Hg^{++} et Hg^+ mais aussi des combinaisons organomercuriques elles-mêmes (BOLLE et WENGER, 1947).

Les taches apparaissent peu à peu en violet mauve ; certaines peuvent cependant présenter des nuances se rapprochant du bleu.

L'examen a lieu à contre-jour en appliquant par exemple la feuille sur une vitre. On marque les taches sans tarder à l'aide d'un crayon bille car les colorations ne sont pas stables.

On peut aussi révéler avec les vapeurs d'hydrogène sulfuré qui donne des taches brunes ou noires de SHg. Cette technique est moins commode mais a l'avantage de donner des taches stables.

Résultats - discussion

La chromatographie après mercurisation présente quelques difficultés en relation avec la nature plus ou moins complexe des réactions mises en jeu lors de la fixation de l'acétate mercurique.

Il est évident qu'un chromatogramme peut ne pas révéler la présence d'un composé éthylénique si l'opération de mercurisation a été inopérante. Ce peut être le cas lorsque l'on fait intervenir une quantité insuffisante d'acétate mercurique en présence de composés éthyléniques dont les concentrations et les affinités sont relativement plus grandes que celles du produit recherché. Mais il est également possible que le composé organo-mercurique formé soit trop instable et perde de ce fait son métal de constitution (précipitation d'acétate mercureux).

Signalons en passant que les doubles liaisons des noyaux aromatiques (cf. cymène) ne fixent pas l'acétate mercurique dans les conditions opératoires indiquées précédemment.

Par contre un composé éthylénique peut donner plus d'une tache, par exemple s'il renferme plus d'une double liaison. Ainsi une dioléfine telle que le limonène donnera 2 taches comme nous le verrons plus loin : une pour une double liaison mercurisée, et une pour le produit contenant à la fois les deux doubles liaisons mercurisées.

De plus, il peut y avoir des réactions secondaires — rares en ce qui nous concerne —, des isoméries et des formes en équilibre. Ces particularités peuvent expliquer la présence de traînées ou de comètes.

Dans la pratique, les faits signalés précédemment ne constituent pas un obstacle important.

Prenons le cas d'un composé diéthylénique, le limonène, que nous avons pu obtenir à l'état pur, et effectuons une chromatographie ascendante après l'avoir mercurisé selon la gamme progressive suivante :

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Acétate de Hg 0,1 M. dans le méthanol.....	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1	1,50
Limonène.....	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Méthanol.....	1,95	1,90	1,75	1,50	1,25	1	0,50

(quantités exprimées en ml)

Laisser en contact une heure à la température ambiante, déposer 2 μ l du contenu de chaque tube sur le papier imprégné d' α -bromonaphtalène, puis développer à l'aide du solvant mobile : acétone- α -bromonaphtalène-isopropylamine-eau = 60:1,20:0,50:38,30.

Sur les chromatogrammes obtenus (fig. 4), on observe deux séries de taches. Celles de la première ont un Rf constant voisin de 0,24 ; leur intensité est croissante jusqu'au tube (5) et décroissante à partir de (6).

Les taches de la deuxième série sont en comète. Elles apparaissent à partir de (3) vers Rf 0,31, puis atteignent progressivement un Rf constant de 0,62 en (6) et (7). Leur intensité va en augmentant jusqu'au dernier tube. La tache de Rf 0,90 apparaissant en (7) correspond à l'excès d'ion mercurique¹.

Bien qu'elle doive être exprimée avec prudence, l'interprétation de ces chromatogrammes présente un grand intérêt. On est ainsi conduit à penser que chacune des deux doubles liaisons ne réagit pas avec une égale affinité avec l'acétate mercurique. L'apparition plus précoce de la tache de Rf 0,24 incite à considérer que la double liaison mercurisée du produit correspondant est la plus réactive (celle du groupement isopropyldène). Quant à la tache comète de Rf 0,62, elle est attribuable au dérivé dimercurisé plus hydrophile que le monomercuré.

Les alcools terpéniques éthyléniques (géraniol, linalol, α -terpinéol, etc.), et leurs esters, présentent aussi le phénomène de dualité et même de pluralité des taches, mais il faut alors, surtout dans ce dernier cas, tenir compte de la présence possible d'impuretés interférentes.

Une seule tache est cependant observée pour les substances suivantes : anéthol, apiol, camphène, carvone, citronellal, citronellol, acétate de citronellyle, estragol, eugénol, α -pinène², pulégone.

On notera pourtant que la tache du citronellol est coiffée d'une comète à partir d'une certaine concentration en acétate mercurique.

Ces exemples résument en quelque sorte, les difficultés rencontrées dans la chromatographie avec mercurisation préalable. Un certain nombre d'entre elles se trouveront cependant réduites dans la pratique ; ainsi, bien souvent, grâce à des concentrations modérées de réactif mercurique, les substances susceptibles de donner 2 taches (ou même 3), n'en donneront qu'une.

Plus généralement, en limitant la quantité d'acétate mercurique, on obtiendra, pour les mêmes essences, des chromatogrammes plus nets car moins encombrés par des traînées ou des taches surnuméraires comme celles des dioléfinés.

La technique des gammes à concentrations croissantes de réactif est à préconiser. Les premiers tubes donneront des chromatogrammes plus facilement lisibles ; les taches observées corres-

1. La tache de Rf 0,9 serait vraisemblablement constituée par un complexe soluble, l'hydrate diacétone trimercurique (MARQUARDT et LUCE 1949).

2. Nous sommes heureux de remercier Mme HARISPE, Assistante à la Faculté de Pharmacie de Paris, déléguée au Collège de France comme Chargée de recherches au C.N.R.S. qui nous a aimablement procuré de l' α -pinène très pur.

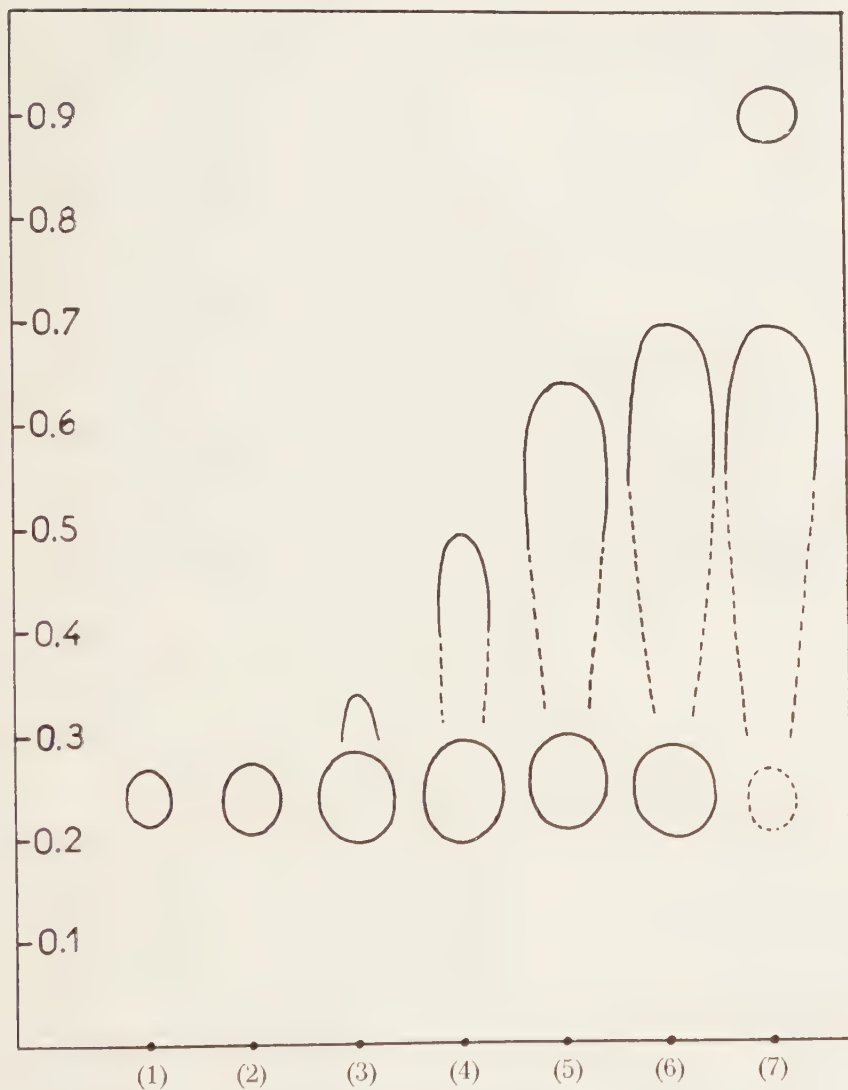


Fig. 4. — Chromatographie sur papier du limonène après mercuration.
Effet des concentrations croissantes en acétate mercurique.

pondront aux composés éthyléniques prédominants par la concentration ou présentant une plus grande affinité. Inversement, les derniers tubes auront surtout pour intérêt de mettre en évidence les composés moins affines ou de faible concentration, relativement aux autres présents.

Un avantage important de la chromatographie après mercurisation est de permettre des révélations très sensibles, particulièrement avec le système α -bromonaphtalène-acétone-eau-isopropylamine. Lorsque la réaction de mercurisation est effectuée avec un rendement suffisant, on peut ainsi déceler une fraction de microgramme de substance telle que limonène, anéthol, apiol, carvone, eugénol, etc. De plus, la sensibilité de la réaction à la diphenylcarbazonne est telle, que lors de l'utilisation de substances témoins, il arrive qu'on observe la présence de taches supplémentaires dues à des impuretés et qu'il faut se garder d'imputer à la substance témoin elle-même.

Quels que soient les systèmes de partage utilisés, on retrouve encore ici le problème de la variation du Rf en fonction de la grandeur du microdépôt. Ces variations, lorsqu'elles existent, sont généralement les plus sensibles pour les taches de très faible intensité. Pour une augmentation du microdépôt, on observera une élévation du Rf avec le système au bromonaphtalène et une diminution avec le système au formamide. Il est vrai que dans ce dernier cas il s'agit de chromatographie en phase non inversée.

CHAPITRE IV

APPLICATION AUX ESSENCES OFFICINALES

Essences étudiées

Les trois principales méthodes décrites dans les chapitres précédents :

- chromatographie sur couche mince d'acide silicique,
- chromatographie sur papier hydrofugé par la paraffine chlorée,
- chromatographie sur papier après mercurisation, ont été appliquées à l'étude de dix-sept essences officinales : Anis, Bergamote, Cannelle de Ceylan, Chénopode vermifuge, Citron, Eucalyptus, Girofle, Lavande, Lavandin, Menthe poivrée, Niaouli, Orange du Portugal, Persil, Romarin, Rose, Térébenthine, Thym.

A cette liste ont été ajoutées les essences de Badiane, Lavande aspic, Cannelle de Chine, feuilles de Giroflier, en raison de leur similitude ou de leur parenté avec quelques-unes des essences officinales.

Les essences étudiées sont pour la plupart des échantillons com-

merciaux. Dans quelques cas nous avons opéré sur des essences d'origine garantie (Bergamote, Citron, Menthe, Niaouli, Orange du Portugal) ou préparées par nous au laboratoire à l'aide d'un petit appareil à entraînement à la vapeur d'eau en cycle fermé (essences d'Anis, de Badiane, de Persil).

Les essences présumées anciennes ont été écartées dans la mesure du possible.

Au début de chaque monographie est indiquée la composition de l'essence étudiée, le plus souvent d'après les renseignements donnés par les traités de GUENTHER (1948 à 1952) ou de GILDMESTER (1956 à 1961). Une bibliographie complémentaire est ajoutée pour diverses essences.

Dans ce travail nous avons laissé de côté l'identification des acides volatils qui sont présents dans certaines essences, mais n'en sont pas les constituants les plus caractéristiques.

Techniques utilisées

Elles ont été décrites dans les chapitres précédents, toutefois il n'est pas inutile de donner quelques précisions sur chacune d'elles.

1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'ACIDE SILICIQUE

Les chromatoplaques ont été préparées une demi-journée à l'avance à partir d'acides siliciques additionnés de plâtre et provenant de trois fournisseurs différents :

CAMAG : D 5 (a, b, c, correspondant à trois livraisons différentes) et DF 5,

FLUKA,

MERCK : Kieselgel G.

Les microdépôts sont de 0,5 μ l d'essence telle quelle, prélevée à l'aide d'une micropipette de 1 μ l.

Dans quelques cas, la prise d'essai a été abaissée à raison de 1 ou 2 μ l de dilution au 1/20 (soit 0,05 ou 0,10 μ l d'essence) afin que les taches des composants en forte proportion (par exemple le cinéol des essences d'Eucalyptus ou de Niaouli) aient un Rf plus exact ou qu'elles soient mieux séparées (cf citronellol et géraniol de l'essence de Rose) ; les valeurs obtenues dans ce cas figurent entre crochets.

Tout en cherchant à mettre en évidence le maximum de taches réparties sur toute la longueur des chromatogrammes, divers solvants mobiles ont été choisis pour répondre aux particularités de chaque huile essentielle et à la mise en valeur des taches les plus caractéristiques.

Les résultats présentés ont été le plus souvent obtenus avec un liquide mobile composé de chlorure de méthylène et de 3 à 10 pour cent v/v d'éther isopropylique.

Les chromatogrammes des essences d'Eucalyptus, de Girofle, de Menthe et de Niaouli ont été réalisés avec un solvant mobile composé de benzène et d'éther isopropylique (20 pour cent v/v).

La composition quantitative de ces solvants doit être quelque-

fois légèrement modifiée, la qualité d'acide silicique utilisé, même provenant d'un même fournisseur, n'étant pas absolument constante.

Parallèlement à l'utilisation de chacun des milieux ci-dessus, les hydrocarbures de chaque essence ont été chromatographiés à l'aide de l'hexane seul. Avec ce solvant, les composés oxygénés sont retenus dans le premier tiers du parcours, principalement près de la ligne de départ.

En chromatographie sur couche mince nous divisons donc l'étude de chaque essence en deux rubriques :

A) Celle des composés oxygénés (les hydrocarbures sont situés près du front).

B) Celle des hydrocarbures.

Révélation

Les chromatoplaques ont toujours été examinées aux U.V. avant l'action de réactifs chimiques.

A) Composés oxygénés :

Les réactifs suivants sont systématiquement utilisés : vanilline en milieu sulfurique, 2-4-dinitrophénylhydrazine en milieu sulfurique (à froid pour révéler les composés carbonylés, à chaud pour d'autres substances), orthodianisidine (aldéhydes), dibromoquinone chlorimide, puis carbonate disodique (phénols).

Les trois derniers réactifs sont utilisés à froid sauf mention spéciale.

D'autres révélateurs n'ont été employés qu'à titre complémentaire : trichlorure d'antimoine, sulfate ferreux ammoniacal (ascaridol), hydrazone de la 3-méthyl 2-benzothiazolone puis chlorure ferrique (aldéhydes aliphatiques), acide trichloracétique en solution chloroformique (menthofurane).

B) Hydrocarbures :

Le trichlorure d'antimoine, qui paraît le plus général, a été employé dans tous les cas.

2 - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER IMPRÉGNÉ DE PARAFFINE CHLORÉE

Les papiers (Arches 304) ont été hydrofugés avec une paraffine chlorée à 50 pour cent de chlore et d'une viscosité de 10 stokes, environ, à 25 °C.

Les microdépôts sont effectués dans les mêmes conditions que pour les plaques.

Solvants mobiles :

Acétone - eau : 50 - 50.

Acétone - eau : 60 - 40.

Acétone - eau : 65 - 35.

Acétone - méthanol - eau : 34 - 17 - 49 (essence de Cannelle).

En plus des U.V., les révélateurs suivants dont la composition a été donnée précédemment sont tous utilisés à froid : permanganate de potassium en milieu alcalin (Na_2CO_3), 2-4-dinitrophényl-

hydrazine en milieu chlorhydrique, orthodianisidine, dibromoquinone chlorimide, puis Na_2CO_3 .

Des réactifs spéciaux sont également utilisés pour certaines essences (Chénopode).

3 - CHROMATOGRAPHIE APRÈS MERCURISATION

Le papier imprégné d' α -bromonaphtalène a été utilisé pour toutes les essences avec la formule suivante comme solvant mobile :

Acétone	60 ml
} α -bromonaphtalène.....	1,20 ml
} Isopropylamine	0,50 ml
} Eau distillée.....	Q.S.P. 100 ml

Ce système de partage ne diminue pas la sensibilité de la révélation avec la diphénylcarbazone ; le système formamide/benzène-isopropylamine n'a été présenté qu'à titre d'exemple pour l'essence de térébenthine.

Pour chaque essence, un seul milieu de mercurisation est le plus souvent proposé. Il a été choisi après avoir vérifié par l'expérience, qu'il donne toutes les taches susceptibles d'être notées à partir d'une gamme de mercurisation progressive.

Par contre, deux milieux de mercurisation paraissent recommandables ou même nécessaires pour les essences d'Eucalyptus et de Menthe.

Mais il ne s'agit là que d'un minimum d'expérimentation et il est toujours préférable d'opérer sur une série complète de mercurisation.

Le mode de préparation des témoins est précisé parallèlement à celui des essences.

Lorsqu'un composé donne deux, ou même trois taches, elles sont signalées dans la colonne des témoins par les lettres (a), (b), (c).

Si une tache est en comète (Cm), la mention du Rf n'a qu'une valeur indicative étant donné sa grande variabilité.

Interprétation

L'interprétation des taches constitue souvent un problème pour chacune des trois techniques.

La composition des huiles essentielles est en général complexe et de nombreuses taches restent non identifiées faute de témoins.

L'identification des composés ne figure le plus souvent que dans une ou deux des trois techniques chromatographiques proposées et pourrait paraître à ce titre, insuffisante. En fait, ces composés ont également été identifiés au cours d'études préalables de mise au point, mettant en jeu d'autres solvants. Par ailleurs, dans quelques cas, la spécificité ou même la sensibilité particulière de certaines réactions permettent d'acquérir d'emblée une certitude.

Les chiffres de Rf, donnés à titre indicatif, ne sont pas de valeurs moyennes calculées ; ils correspondent aux résultats recueillis sur un chromatogramme bien représentatif, retenu à côté de plusieurs autres obtenus dans des conditions opératoires similaires. Dans les trois techniques utilisées, il existe en effet, comme nous l'avons vu, de grandes causes de variation. Celles-ci tiennent, dans le cas des chromatoplaques en particulier, à la qualité de l'adsorbant (p. 37), à la technique de préparation des plaques, à l'humidité de l'air, etc. Il est inutile de se fonder sur des moyennes et sur le calcul statistique, les variations étant trop importantes d'une expérience à l'autre. Seuls sont interprétables les résultats obtenus par rapport à des témoins externes et internes utilisés en quantités judicieusement établies.

Certaines taches sont inconstantes suivant les échantillons ; elles sont mentionnées par le signe i_n , n indiquant le numéro 1, 2, 3, etc., de l'essence, pour laquelle la tache est observée. Cette inconstance peut être due à des modifications dans la composition de l'essence, et l'on sait combien celles-ci dépendent des conditions écologiques, géographiques et climatiques notamment. Mais le vieillissement constitue un des facteurs de variation les plus importants. D'une façon assez générale on remarque que les essences surannées, lorsque la révélation est effectuée sur plaque avec la vanilline sulfurique, laissent, associée ou non avec quelques petites taches, une traînée sombre de quelques centimètres à partir du point de départ. Cette observation indique la présence de composés relativement plus polaires ayant pris naissance par oxydation à l'air.

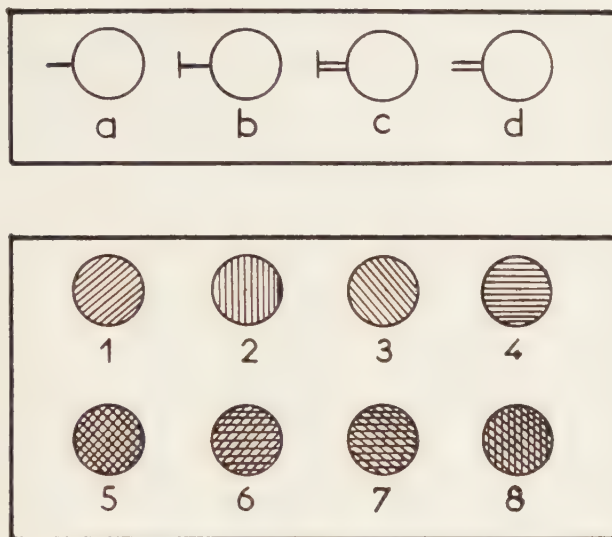
Certaines taches de faible intensité sont peu reproductibles, elles sont marquées par le signe $\pm$.

Le degré d'intensité d'une tache est représenté avec une à quatre croix (+).

Abbreviations

bg. :	beige	n. :	noir
bi. :	bistre	oc. :	ocre
bl. :	bleu	ol. :	olive
br. :	brun	oré. :	orangé
brt. :	brunâtre	pr. :	pourpre
ch. :	chaud	rg. :	rouge
cl. :	clair	rgt. :	rougeâtre
Cm. :	comète	rs. :	rose
fc. :	fugace	rsé. :	rosé
cr. :	crème	rx. :	roux
fr. :	froid	sa. :	saumon
g. :	gris	ve. :	vert
gt. :	grisâtre	vet. :	verdâtre
i. :	inconstant	vi. :	violet
mr. :	marron	vié. :	violacé
mv. :	mauve		

Fig. 5. — Mode de représentation des taches et de leurs couleurs.



Haut : *Examen en lumière de Wood :*

a : bleu, bleu violacé.

b : jaune-vert.

c : jaune d'or.

d : rouge.

Bas : *Examen en lumière visible après action des réactifs révélateurs :*

1 : bleu.

2 : gris, grisâtre.

3 : rose, rouge, rougeâtre.

4 : jaune, jaunâtre.

5 : mauve, violet, violacé.

6 : vert, verdâtre.

7 : orangé.

8 : bistre, brun, brunâtre, marron.

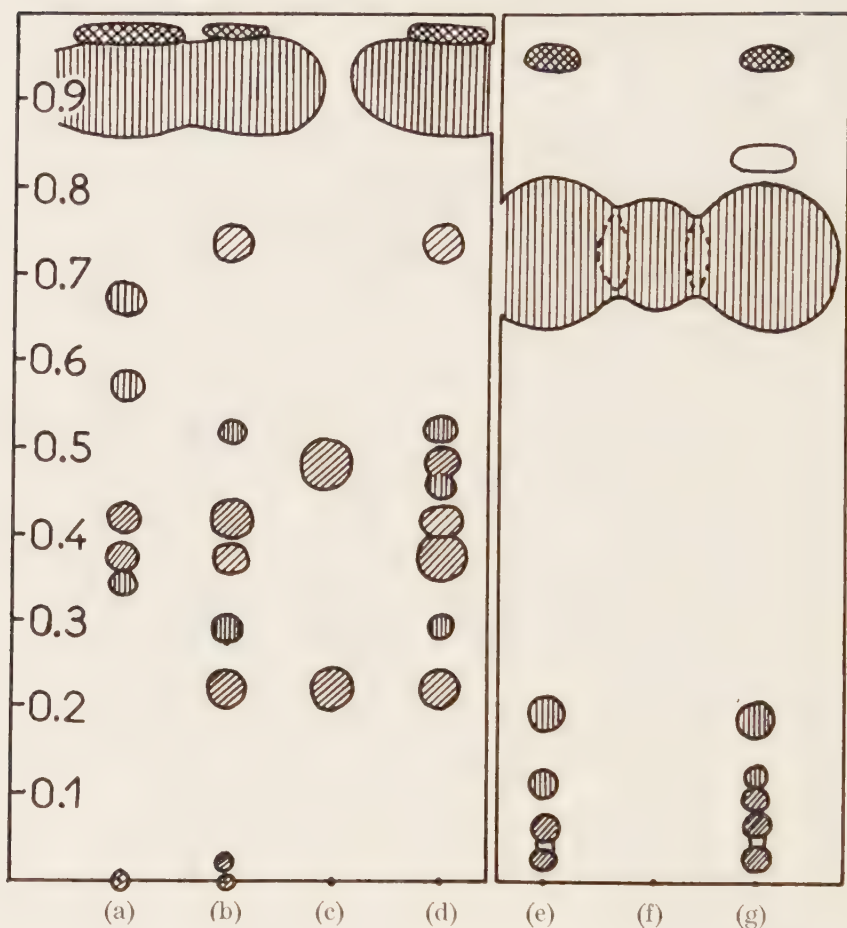


Fig. 6. — *Essences d'Anis et de Badiane* (chromatoplaques).

I. — Partie gauche (Rev. à la vanilline sulfurique) :

Solvant mobile	Chlorure de méthylène.....	93
	éther isopropylique.....	7

(a) : essence d'Anis (1) et (5). (c) : α -terpinéol (bas), cinéol (haut).

(b) : essence d'Anis (2), (3), (4). (d) : essence de Badiane.

II. — Partie droite (iode-rhodamine 6G-L. de Wood, puis vanilline sulfurique) :

Solvant mobile : benzène.

(e) : essence d'Anis. (f) : anéthol. (g) : essence de Badiane.

ESSENCE D'ANIS

ORIGINE

Essence retirée des fruits d'Anis vert, *Pimpinella anisum* L., Umbellifères, par distillation à la vapeur d'eau.

COMPOSITION

Hydrocarbures : petites quantités de terpènes, un sesquiterpène.

Aldéhydes : Aldéhyde anisique, acétaldéhyde.

Cétones : p-méthoxyphénylacétone ou cétone anisique.

Ethers oxydes : Anéthol (80 à 90 pour cent), méthylchavicol (isomère du précédent).

L'essence d'Anis contient également des composés sulfurés qui sont éliminés par rectification.

Travaux à consulter : MONOD et DE DORTAN (1955),
FUJITA et NAGASAWA (1960).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : quatre échantillons commerciaux (1) à (4),
une essence préparée au laboratoire (5).

Etant donné l'analogie de composition, plusieurs essences de Badiane, dont l'une a été préparée au laboratoire, ont été examinées par comparaison.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 6)

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c),

Liquide mobile : chlorure de méthylène-éther isopropylique : 93-7,

Durée du développement : 1 h 10 mn,

Température : 21°.

Résultats

Rf	Vanilline sulfurique		O. D. A. éch. (1) à (5)	Interprétation
	éch. (2) (3) (4)	éch. (1) (5)		
0,23	bl.			
0,29	g. bl. ±			
0,34	—	g. vié.		
0,37	bl.	g. bl. ±		
0,39	—	—	j. +	Aldéhyde?
0,42	bl.	g. bl. ±	—	
0,52	g. vié ±	—	j. ++	Ald. anisique (T. : 0,52)
0,56	—	gt. ±	—	
0,68	—	g. mv. ±	—	
0,74	bl. ±	—	—	
0,92	g. mv. ++++	g. mv. ++++	—	Anéthol (T. : 0,92)
0,97	vi.	vi.	—	Hydrocarbures

Révélation par la vanilline sulfurique : à part celle de l'anéthol, les taches des essences (1) et (5) sont faibles et, dans l'ensemble, différentes de celles des essences (2), (3), (4). Peut-être s'agirait-il seulement d'une différence d'âge entre les deux groupes.

Les échantillons examinés ne semblent pas présenter la tache du cinéol contrairement à la Badiane. Cependant un d'entre eux a donné une tache de même Rf mais peu nette. Ce mode de différenciation des deux essences paraît donc utile sans être toutefois absolu.

Révélation par l'orthodianisidine : deux taches constantes, la plus intense étant celle de l'aldéhyde anisique. Ces deux taches existent pour l'essence de Badiane et la deuxième est relativement plus forte pour la Badiane que pour l'Anis.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck,
Liquide mobile : hexane,
Durée du développement : 35 minutes,
Température : 24°.

Résultats

Rf	Sb Cl ₃ visible	Sb Cl ₃ Wood	Interprétation
0,17	j. gt.	g. jt.	Anéthol
0,44	—	g. cl.	
0,48	g. rs.	bg. cl.	
0,58	—	g. cl.	
0,70	vi. mv.	bg. cl.	
0,81	g. rs.	j. cl.	
0,90	—	g. cl.	
0,97	g. ±	bg. cl.	

L'anéthol révélé en jaunâtre par le chlorure d'antimoine, donne une tache allongée de faible Rf.

Les autres taches, analogues pour les échantillons examinés, et correspondant à des hydrocarbures, n'ont pas été identifiées.

A noter que les chromatogrammes d'essence de Badiane sont souvent comparables et que la différenciation semble aléatoire par cette méthode. Par contre, celle qui est proposée ci-après semble digne d'intérêt.

RECHERCHE DE L'ESSENCE DE BADIANE (fig. 6)

La chromatographie est effectuée sur couche mince d'acide silicique contenant de la Rhodamine 6 G (cf. chapitre I), avec le benzène comme phase mobile.

La révélation sous lumière de Wood en présence de vapeurs d'iode, fait apparaître nettement, entre autres, une tache sombre située entre celles de l'anéthol et des hydrocarbures, de Rf générale-

ment voisin de 0,83. Cette tache n'existe pas pour l'essence d'Anis. Elle n'a pu encore être identifiée.

Ce mode de révélation, très sensible, nous a permis de déceler 5 pour cent d'une essence de Badiane ajoutée à une essence d'Anis.

La figure 6 (partie droite) représente les chromatogrammes obtenus après révélations successives, par la technique précédente et par la vanilline sulfurique.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau = 65 - 35,
Parcours de la phase mobile : 182 mm,
Durée du développement : 5 heures,
Température : 22°.

Résultats

Rf	KMnO ₄ Na ₂ CO ₃	O. D. A.	Interprétation
0,07 [0,31 0,30] 0,68	br., ±, i ₁ br. + + + + —	j.	Sesquiterpène ? Anéthol (T. : 0,31) Aldéhyde anisique (T. : 0,68)

Révélation avec le permanganate de potassium : tache très intense d'anéthol (présente également pour l'essence de Badiane), autres taches peu nettes.

Révélation avec l'O.D.A. : une tache jaune correspondant à l'aldéhyde anisique (Rf 0,68).

Dans ces conditions l'essence de Badiane donne deux taches (Rf 0,63 et 0,68).

3) Chromatographie après mercuration

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURATION

	Anéthol	Essence
Produits	0,01 ml	0,02
Réactif	0,75	0,75
Méthanol.....	0,25	0,25
MICRODÉPOTS	2 µl	4 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
	0,08 0,13 0,21 +	
Anéthol : 0,44	0,44 + + + + 0,73 +	Anéthol
Ion mercurique : 0,90	(Hg + + : 0,90)	Hg + + en excès

L'anéthol est ici nettement mis en évidence. La tache obtenue est grande et de forte intensité.

La tache 0,73 est plus apparente si on utilise dans le milieu de mercurisation ci-dessus 0,01 ml d'essence au lieu de 0,02 ml.

Les essences de Badiane examinées par comparaison donnent des chromatogrammes d'aspect voisin : toutefois les taches de Rf 0,08 - 0,13 sont plus distinctes entre elles et celle de Rf 0,21, bien arrondie est nettement plus affirmée ; enfin entre les Rf 0,44 et 0,73 on observe en outre une tache comète (phellandène, limonène ?).

Conclusion :

Les chromatogrammes des essences d'Anis et de Badiane sont assez voisins dans l'ensemble. Néanmoins, une des techniques proposées permet de différencier l'essence de Badiane.

ESSENCE DE BERGAMOTE

ORIGINE

Essence obtenue par expression de la partie externe du péricarpe du fruit frais de *Citrus limetta* Risso, var. *bergamia*, Rutacées.

COMPOSITION

Hydrocarbures : d-limonène, α -pinène, β -pinène.

Alcools libres : (19 à 30 pour cent, exprimés en linalol), linalol, alcool dihydrocuminique, nérol.

Aldéhyde : citral.

Esters : acétate de linalyle (34 à 45 pour cent).

Furocoumarines : bergaptène (5 pour cent), bergaptol, limettine (= citroptène), bergamottine (éther géranylique du bergaptol).

Travaux à consulter : SABETAY et TRABAUD (1943),
THEILE et coll. (1960).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : trois échantillons commerciaux d'origine sicilienne.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 8)

Conditions opératoires

Acide silicique : D F 5 Camag.

Liquide mobile : chlorure de méthylène — éther isopropylique =
90 — 10.

Durée du développement : 1 h 20 mn.

Température : 20°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	Vanilline-H ₂ SO ₄	O. D. A.	Interprétation
0,14	bl.	—	—	Nérol (T. : 0,33)
0,17	bl.	—	—	
0,22	bl.	—	—	
0,24	bl.	—	—	
0,28	—	bl.	—	
0,33	—	bl.	—	Linalol (T. : 0,49)
0,36	—	—	br. (ch)	
0,39	—	j. ve (Wood)	i ₂₋₃	
0,49	—	bl. +++	—	
0,50	bl. ++	—	—	
0,58	rg., i ₁	—	—	Citral (a + b) (T. : 0,70)
0,60	j. ve. ++	—	—	
0,66	bl.	—	—	
0,70	—	bl. ++	j. ++	
0,78	j. ve.	ve. bl.	—	
0,87	—	bl. ++++	—	Acétate de linalyle (T. : 0,87)
0,98	—	bl.	—	Hydrocarbures

Aux U.V., plusieurs taches fluorescentes ; celle de Rf 0,60, jaune-vert, correspondrait au bergaptène.

Après vanilline sulfurique, sont révélées deux taches bleues importantes, l'une correspondant au linalol (Rf : 0,49), l'autre à l'acétate de linalyle (Rf : 0,87) et deux plus faibles : nérol (Rf : 0,33) et citral (Rf : 0,70) (jaune après o-dianisidine). Aux U.V., une tache supplémentaire apparaît en jaune-vert (elle est retrouvée avec le même Rf dans l'essence d'Orange du Portugal).

A noter qu'avec un autre solvant (hexane - acétate d'éthyle), le citral donne deux taches, correspondant vraisemblablement aux deux isomères a et b.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G MERCK,

Liquide mobile : hexane,

Durée du développement : 40 mn,

Température : 25°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,45	g. rs.	bg.	Limonène (T. : 0,66)
[0,66] 0,70	g.	cr.	
0,80	g. rgt.	bg.	β-pinène ? (T. : 0,91)
0,91	g.	g. cl.	

Le limonène est nettement mis en évidence, ainsi qu'un autre hydrocarbure correspondant vraisemblablement au β-pinène.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau : 65 - 35.

Parcours de la phase mobile : 182 mm,

Durée du développement : 5 h,

Température : 22°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	KMnO ₄ Na ₂ CO ₃	O.D.A.	Interprétation
0,10	bl. vi.	—	j. gt.	Acétate de linalyle (T. : 0,25)
0,25	—	br. +++	—	
0,38	bl. vi.	—	—	Citral (a + b) (T. : 0,42)
0,42	—	br. +	jt. +	
0,58	bl. vi.	—	—	Linalol (T. : 0,60)
0,60	—	br. +++	—	
0,67	bl. cl.	—	—	

Trois taches nettes sont révélées par le permanganate de potassium ; elles correspondent à l'acétate de linalyle (Rf : 0,25), au citral (0,42) et au linalol (0,60). Le citral est révélé en jaune par l'ortho-dianisidine.

3) Chromatographie après mercurisation

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURISATION

	Limonène	Linalol	Essence
(Produits	0,01 ml	0,01	0,01
(Réactif	0,50	0,25	0,75
(Méthanol	0,50	0,75	0,25
MICRODÉPOTS	1 µl	1 µl	4 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
	0,11	
	0,16	
Limonène (a) : 0,26	0,26	Limonène
	0,37	
Linalol (a) : 0,47	0,47	Linalol
Limonène (b) : 0,65 (Cm)	0,65 (Cm)	Limonène
Linalol (b) : 0,78	0,79 + + + +	Linalol
Ion mercurique : 0,91	(Hg + + 0,91)	Hg + + en excès

Cette méthode met en évidence le limonène (deux taches correspondant à deux degrés de mercurisation) et le linalol.

Conclusion :

Les principaux constituants de l'essence de Bergamote sont aisément identifiés.

En lumière ultraviolette, de nombreuses taches fluorescentes (furocoumarines) donnent un aspect caractéristique aux chromatogrammes sur plaque (l'essence de Citron présente des taches fluorescentes analogues).

A noter la mise en évidence du citral (a et b) dont la présence n'est que rarement signalée dans la littérature.

Dans l'essence de Lavande qui renferme également linalol et acétate de linalyle, on ne met en évidence qu'une seule tache fluorescente faible; le citral est absent, et le limonène est peu visible.

L'essence de Citron renferme davantage de citral, peu de linalol et des esters (acétate de linalyle et de géranyle) en faible quantité.

ESSENCE DE CANNELLE DE CEYLAN**ORIGINE**

Essence retirée de l'écorce du Cannellier de Ceylan, *Cinnamomum zeylanicum* Nees, Lauracées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : α -pinène gauche, l-phellandrène (α et β), p-cymène, caryophyllène.

Alcools : l-linalol.

Aldéhydes : aldéhydes cinnamique (65-75 pour cent), hydrocinnamique, benzoïque; furfural.

Cétones : méthyl-n-amylcétone.

Esters : isobutyrate de linalyle.

Phénols : eugénol (4 à 5 pour cent).

Cette essence a été comparée à l'essence de Cannelle de Chine de composition voisine mais ne renfermant ni eugénol, ni linalol.

Il existe dans le commerce, des écorces de Cannelles de Madagascar et des Seychelles, mais non, à notre connaissance, les essences correspondantes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : trois échantillons commerciaux dont un d'essence de Cannelle de Chine.

1) Chromatoplaques**A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 7)****Conditions opératoires**

Acide silicique : Camag (a).

Liquide mobile : chlorure de méthylène - éther isopropylique = 97 - 3.

Durée du développement : 1 h 45 mn.

Température : 24°.

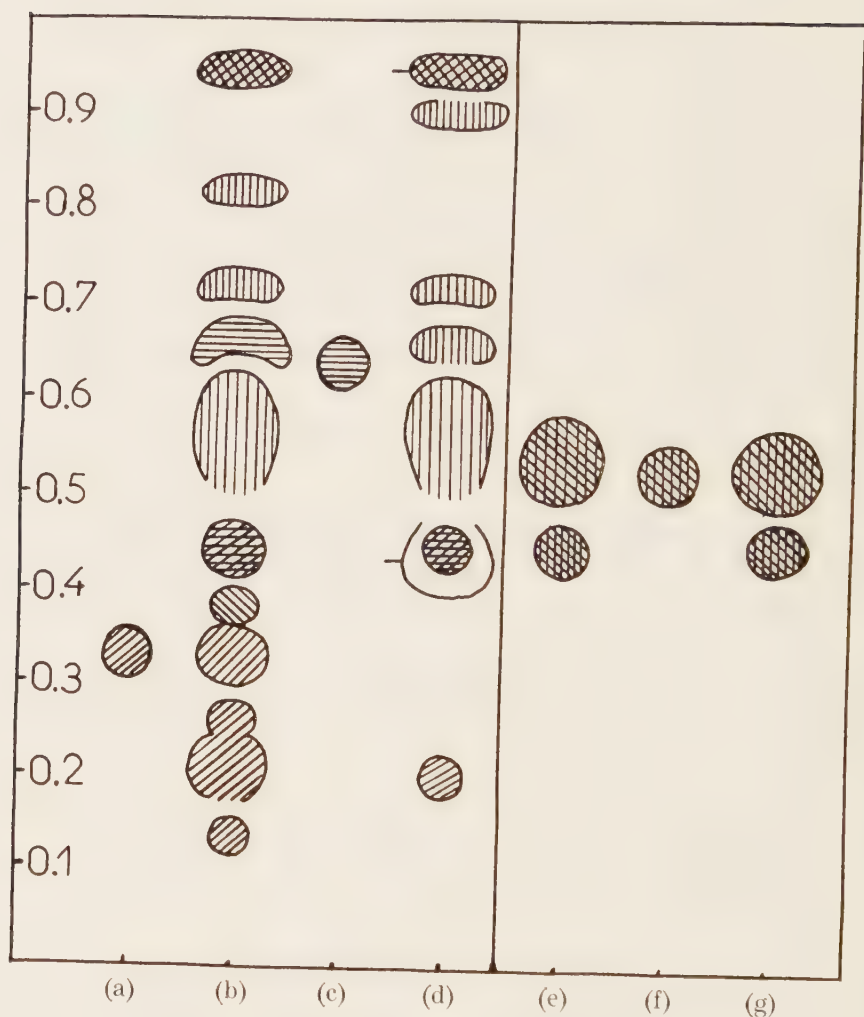


Fig. 7. — *Essences de Cannelles*. (Chromatoplaque.)

Solvant mobile { Chlorure de méthylène 97
 { éther isopropylique 3

Révélation avec la vanilline sulfurique :

(a) : linalol ; (b) essence de Cannelle de Ceylan ;
 (c) : eugénol ; (d) essence de Cannelle de Chine.

Révélation avec o-dianisidine :

(e) : ess. de Cannelle de Chine (50 μ g) ; (f) : aldéhyde
 cinnamique (30 μ g) ; (g) : ess. de Cannelle de Ceylan (50 μ g).

Résultats

Rf	Vanilline + H ₂ SO ₄	O.D.A.	D.B.Q.C.I. NA ₂ CO ₃	Interprétation
0,13	bl.			Linalol (T. : 0,32)
0,21	bl.			
0,25	bl.			
0,32	bl. ++			
0,38	rs. (fc)			
0,43	bl. ve. (fc)	rx.		Ald. cinnamique (T. : 0,48)
[0,48] 0,56	gt. ++	rx. + + + +		
0,66	g. jt. ++	—	bl. vié. ++	
0,71	gt.	oc. j.		
0,82	g. mv.i ₁	—		
0,93	vi.	—		Hydrocarbures

La vanilline sulfurique permet de révéler en bleu le linalol, en grisâtre faible l'aldéhyde cinnamique, et en gris jaunâtre l'eugénol.

L'o-dianisidine et la dinitrophénylhydrazine révèlent les mêmes taches notamment celle intense d'aldéhyde cinnamique.

L'eugénol, avec la dibromoquinone chlorimide, fournit une belle tache bleu violacé (qui n'existe pas avec l'essence de Cannelle de Chine).

N. B. — La tache révélée en ocre jaune par l'O.D.A. est différente de celle de même Rf (0,71) donnée par la vanilline sulfurique.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 35 mn.

Température : 24°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,28	—	bg. cl.	Caryophyllène ? T. : α-pinène 0,93
0,38	g.	bg. cl.	
0,62	vi. mv.	g. mv. ++	
0,93	—	g. cl.	

Différentes taches sont révélées, mais les chromatogrammes obtenus avec l'essence de Cannelle de Chine sont identiques pour cet essai.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - méthanol - eau = 34 - 17 - 49.

Parcours de la phase mobile : 177 mm.

Durée du développement : 5 h.

Température : 24°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	KMnO ₄ + Na ₂ CO ₃	O.D.A.	D.B.Q.C.I. — Na ₂ CO ₃	Interpré- tation
0,11 0,30 [0,49] 0,46	—	br. br br. + + + +	rx. + + + +		Ald. cinnami- que (T. : 0,49) Eugénol (T. : 0,52)
0,54		br. + +	—	bl. vet. + +	
0,62 0,79 0,83	— — bl.	br. br. —	— — —		

Le permanganate de potassium révèle intensément l'aldéhyde cinnamique et plus faiblement l'eugénol (mis en évidence sous forme d'une tache bleu verdâtre par la dibromoquinone chlorimide).

3) Chromatographie après mercurisation*Conditions opératoires*

MILIEUX DE MERCURISATION

	Linalol	Eugénol	Essence
Produits.....	0,01 ml	0,01	0,02
Réactif.....	0,25	0,25	0,25
Méthanol.....	0,75	0,75	0,75
MICRODÉPOTS.....	1 µl	1 µl	4 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
	0,09 0,15 0,25 0,37	
Linalol (a) : 0,46	0,45 + + 0,60	Linalol
Linalol (b) : 0,78 Eugénol : 0,80 Ion mercurique	0,81 + + + (Hg + + : 0,91)	Eugénol-linalol Excès d'Hg + +

La technique de mercurisation ne paraît pas être applicable à l'aldéhyde cinnamique qui est le constituant principal de l'essence. L'eugénol donne une tache (Rf : 0,81).

Les taches 0,09-0,37-0,45-0,60-0,81 sont absentes dans l'essence de Cannelle de Chine examinée.

Conclusion :

L'étude comparative avec une essence de Cannelle de Chine a permis de vérifier la présence de composants communs (aldéhyde cinnamique, certains hydrocarbures) ou non (absence d'eugénol et de linalol dans l'essence de Chine).

La différenciation des deux essences ne présente pas de difficulté quelle que soit la technique suivie.

ESSENCE DE CHENOPODE VERMIFUGE

ORIGINE

Essence retirée des feuilles de *Chenopodium ambrosioides*, variété *anthelminthicum* Gray, Chénopodiacées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : p-cymène, Δ^3 ou Δ^4 carène, sylvestrène, l-limonène, α -terpinène.

Cétones : d-camphre.

Esters : salicylate de méthyle.

Ethers oxydes : cinéol.

Acides : acide butyrique.

Peroxydes : ascaridol (60 à 80 pour cent), ascaridolglycol.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : 3 échantillons commerciaux.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS

Conditions opératoires

Acide silicique : Camag D 5 (c).

Liquide mobile : Chlorure de méthylène - éther isopropylique
90 : 10.

Durée de développement : 1 h 20 mn.

Température : 19°.

Résultats

Rf	Vanilline — H ₂ SO ₄	O.D.A.	Interprétation
0,03	g. vié		
0,05	g. vié		
0,09	g. vié		
0,12	g. vié		
0,21	bl.	jt	
0,25	bl.		
0,28	bl.		
0,34	bl.	br (ch)	
0,40	bl. vié		
0,45	bl. vié	br (ch)	
0,48	bl.		
0,57	bl.		Cinéol (T. : 0,57)
0,65	g. mv.	rs	
0,68	jt [±]		
0,80	bl. n. + + + +	g.	Ascaridol
0,86	bl.		
0,91	jt., i ₁		
0,95	vié +		

La vanilline sulfurique révèle de nombreuses taches dont une, plus intense, correspond à l'ascaridol. Celle-ci est, de plus, facilement caractérisable par pulvérisation d'une solution aqueuse à 5 pour cent de sulfate ferreux ammoniacal. Il apparaît à froid et au bout de quelques minutes, une tache ocre qui s'amplifie. La réaction est encore perceptible pour un microdépôt de 30 μ g d'essence.

Si on pulvérise successivement la solution de sulfate ferreux ammoniacal, et une solution benzénique de « Tétrabase » (N - N' - tétraméthyldiaminodiphénylméthane) il se développe peu à peu une tache bleue (FOXLEY, 1961).

L'une des 3 essences étudiées donne une tache assez faible pour le cinéol. La révélation de celui-ci paraît en ce cas plus sensible par examen en lumière de Wood après action du réactif au trichlorure d'antimoine.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée de développement : 1 h.

Température : 21°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,75	g.	cr.	Témoin limonène : 0,74
0,81	g. rgt +	cr. +	
0,90	i ₁	g. cl.	

La tache 0,81 est d'intensité constante pour les trois échantillons.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau = 50 : 50.

Parcours de la phase mobile : 185 mm.

Durée du développement : 5 h.

Température : 21°.

Résultats

Rf	KMnO ₄ — Na ₂ CO ₃	O.D.A.	Interprétation
0,32	br. + + + +		Ascaridol
0,56	br. +		
0,66	—	j. gt.	

L'ascaridol est également mis en évidence par le sulfate ferreux ammoniacal à 5 pour cent : tache ocre après quelques minutes de contact.

3) Chromatographie après mercurisation

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURISATION

	Limonène	Essence
Produits.....	0,01 ml	0,02
Réactif.....	0,25	0,75
Méthanol.....	0,75	0,25
MICRODÉPOTS.....	1 µl	4 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
Limonène (a) : 0,26	0,26 + 0,30 0,46	
Limonène (b) : 0,64 (Cm)	0,63 (Cm) 0,71 0,82 i ₃	
Ion mercurique : 0,91	(Hg + + : 0,91)	Ion mercurique en excès

Cette méthode est peu intéressante ici.

Conclusion :

L'ascaridol, constituant principal et caractéristique de l'essence, est facilement identifié sur plaque et sur papier.

Les teneurs en cinéol semblent assez variables d'un échantillon à l'autre.

ESSENCE DE CITRON

ORIGINE

Essence obtenue par expression de la partie externe du péricarpe du fruit du Citronnier, *Citrus medica* L., Rutacées.

COMPOSITION

Hydrocarbures : Limonène droit (75 pour cent environ), α -pinène, β -pinène (environ 20 pour cent des hydrocarbures), γ -terpinène, p-cymène, myrcène, camphène.

Alcools : α -terpinéol.

Aldéhydes : citrals a et b (3 à 5 pour cent), citronellal, n-octanal, n-nonanal, n-décanal, n-undécanal, n-dodécanal.

Cétones : méthylhepténone.

Esters : acétates de linalyle, de géranyle, de néryle, de citronellyle.

Ethers oxydes : cinéol.

Acides : acétique, caprique, laurique.

Furocoumarines : citroptène (= limettine).

Travaux à consulter : CALVARANO (1957), BERNHARD (1960).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : deux échantillons commerciaux.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 8)

Conditions opératoires

Acide silicique : Camag D 5 (c).

Liquide mobile : chlorure de méthylène - éther isopropylique
— 93 : 7.

Durée de développement : 1 h 15 mn.

Température : 22°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	Vanilline H ₂ SO ₄	O.D.A.	Interprétation
0,09	j. d'or	—		
0,13	bl.	—		
0,14	—	bl.		
0,18	j. ve.	—		
0,21	—	bl.		α -Terpinéol (T. : 0,21)
0,25	—	g. bl. +		
0,27	—	g. vié.		
0,31	bl.	—		
0,37	—	bl.		
0,38	bl.	—		
0,43	—	bl.		Linalol (T. : 0,43)
0,48	bl.	—		
0,49	—	bl. ++	j., ++	Citrals (a + b) (T. : 0,49)
0,54	j. ve.	bl. ve.		
0,58	—	g. mv.		
0,68	—	bl.		Esters (T. ac. de géranyle : 0,68)
0,72	—	bl.		Esters (T. ac. de linalyle : 0,72)
0,78	—	g. vié.		Aldéhydes (T. citronellal, nonanal et décanal : 0,78)
0,94	—	bl.		Hydrocarbures

Aux U.V. plusieurs taches fluorescentes (furocoumarines).

En vanilline sulfurique, sont révélés α -terpinéol, linalol, citral, et différents esters.

Les citrals a et b sont réunis en une seule tache révélée en jaune, avec une grande sensibilité, par l'orthodianisidine. Ils sont séparables, si l'on utilise comme liquide mobile, le mélange : hexane - acétate d'éthyle (80 - 20).

La coloration gris violacé de la tache 0,78 pourrait résulter de la présence simultanée de divers aldéhydes de Rf identiques ou très voisins, notamment le nonanal, le décanal, le citronellal ; avec le réactif sulfo-vanillique, les deux premiers donnent une tache grismauve et le troisième une tache bleue.

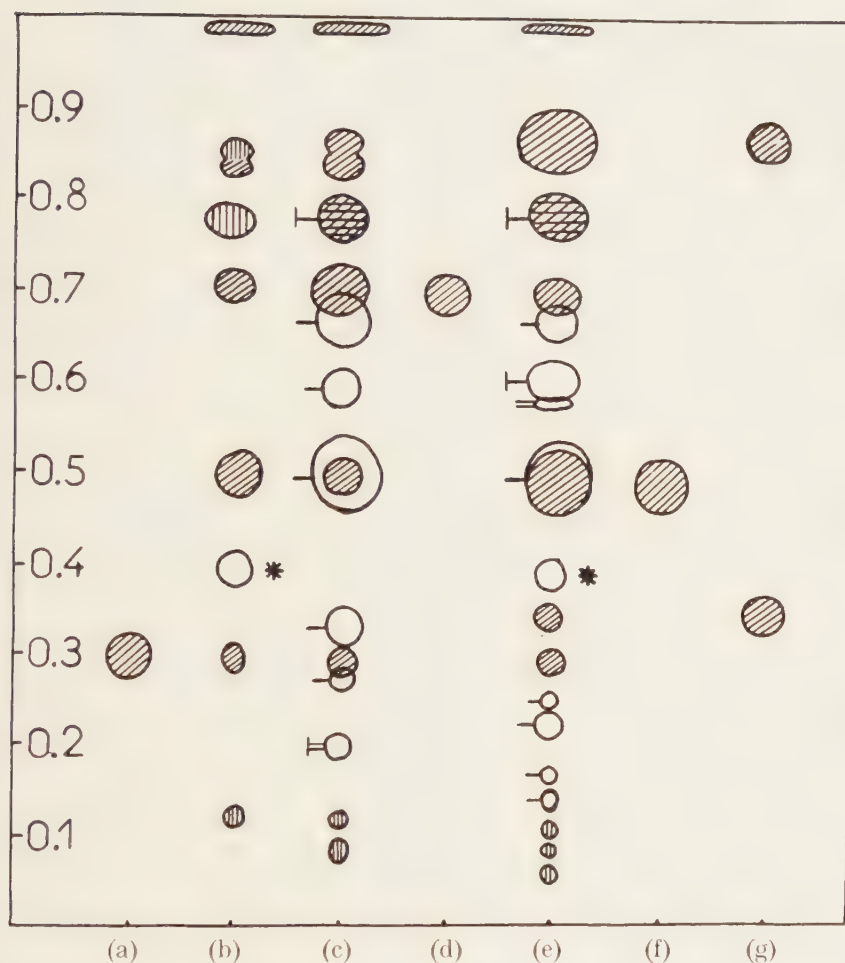


Fig. 8. — *Essences de Bergamote, Citron et Orange douce* (Chromatoplaque).

Solvant mobile : chl. de méthylène-éther isoprop. = 90 : 10.

Révélateur : vanilline sulfurique.

(a) : α -terpinéol ; (b) : ess. d'Orange douce ; (c) : ess. de Citron ; (d) : citral ;
(e) : ess. de Bergamote ; (f) : linalol ; (g) : nérol (en bas), acétate de linalyle
(en haut).

Les deux taches marquées d'un astérisque ne sont visibles qu'après action de la vanilline sulfurique, sous lumière de Wood.

Ces divers aldéhydes donnent une tache bleue par révélation d'après la technique de SAWICKI et coll. utilisant une hydrazone complexe (voir p. 42).

Remarque : sur la figure 8, la chromatographie de l'essence a été effectuée sur la même plaque que celle des essences de Bergamote et d'Orange douce avec un solvant mobile à 10 pour cent v/v d'éther isopropylique. Dans ces conditions la tache des aldéhydes s'est rapprochée du front du solvant et se trouve confondue dans un fond bleu.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 40 mn.

Température : 25°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ (visible)	SbCl ₃ (Wood)	Interprétation
0,46	g. rs.	bg.	Limonène (T. : 0,67)
[0,67] 0,72	g. + + + +	cr. + + + +	
0,81	g. rgt.	bg.	β - pinène (T. : 0,91)
0,91	g. + +	g. cl.	

Le β-pinène, et surtout le limonène, sont nettement caractérisés.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau = 65 : 35.

Parcours de la phase mobile : 182 mm.

Durée du développement : 5 h.

Température : 22°.

Résultats obtenus

Rf	Lumière de Wood	K-MnO ₄ Na ₂ CO ₃	O. D. A.	Interprétation
0,11	bl. vi.	—	—	Esters (T. acétates de géranyle et de linalyle : 0,27)
0,27	—	br. +	—	
0,30	bl. ±	—	—	Citral (a + b) (T. : 0,44)
0,43	—	br. +	jt +	
0,60	bl. vi.	—	—	

Le citral est révélé par le permanganate et l'orthodianisidine ; les esters sont peu visibles.

3) Chromatographie après mercurisation

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURISATION

	Limonène	Essence
Produits.....	0,01 ml	0,02
Réactif.....	0,50	0,75
Méthanol.....	0,50	0,25
MICRODÉPOTS.....	1 µl	4 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
Limonène (a) : 0,26	0,13 + 0,26 + + + + 0,34	Limonène
Limonène (b) : 0,65 (cm)	0,64 (Cm) + + + +	Limonène
Ion mercurique : 0,90	(Hg + + : 0,90)	Hg + + en excès

Le limonène est nettement caractérisé (deux taches, dont une en comète).

L'essence d'Orange donne un chromatogramme d'aspect semblable. La tache 0,13 y est toutefois absente.

Conclusion :

Bien qu'ils soient en faible proportion, des composés oxygénés variés sont mis en évidence sur plaque : α -terpinéol, linalol, aldéhydes dont les citrals a et b, esters. Les furocoumarines donnent en lumière de Wood un aspect caractéristique aux chromatogrammes.

Le limonène est très nettement révélé sur plaque (Sb Cl_3) ou sur papier après mercurisation.

ESSENCE D'EUCALYPTUS

ORIGINE

Essence retirée des feuilles de l'*Eucalyptus globulus* Labill., Myrtacées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : α -pinène droit, camphène, gaïazulène.

Alcools : alcools éthylique, isoamylique, l-pinocarvéol, d-myrténol, i-terpinéol, alcools sesquiterpéniques.

Aldéhydes : aldéhydes butyrique, valérique, caproïque.

Cétones : l-pinocarvone (cétone en C_{10} bicyclique insaturée), carvone, d-verbénone, 3-isopropylène-1-acétyl-5-cyclopentène.

Ethers-oxydes : cinéol (80 - 85 pour cent).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : 3 échantillons commerciaux.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 9)

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c).

Liquide mobile : benzène - éther isopropylique : 80 - 20.

Durée du développement : 1 h 25 mn.

Température : 23°.

Résultats

Rf	Vanilline H ₂ SO ₄	Interprétation
0,19	bl.	Cinéol (T. : 0,60) Hydrocarbures
0,24	bl., i ₂₋₃	
0,30	bl., i ₁₋₃	
0,34	bl., i ₂₋₃	
0,39	bl., i ₃	
[0,60] 0,65	bl. + + + +	
0,97	vié. ±	

A part celle du cinéol, les taches sont, dans l'ensemble, de faible intensité.

B. — HYDROCARBURES (fig. 9)

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 1 h.

Température : 20°.

Résultats

Rf	SbCl ₅ visible	SbCl ₅ Wood	Interprétation
0,64	g.	g. cl.	α - pinène : 0,95
0,79	—	g. cl.	
0,88	—	g. cl.	
0,95	—	g. cl.	

Dans cette technique, le cinéol reste au point de départ ; les taches d'hydrocarbures sont faibles et peu nombreuses.

2) Papier à la paraffine chlorée

Les réactifs utilisés ne permettent de révéler aucun composant, alors que l'essence de Niaouli fait apparaître, dans les mêmes conditions, la tache de l'α-terpinéol.

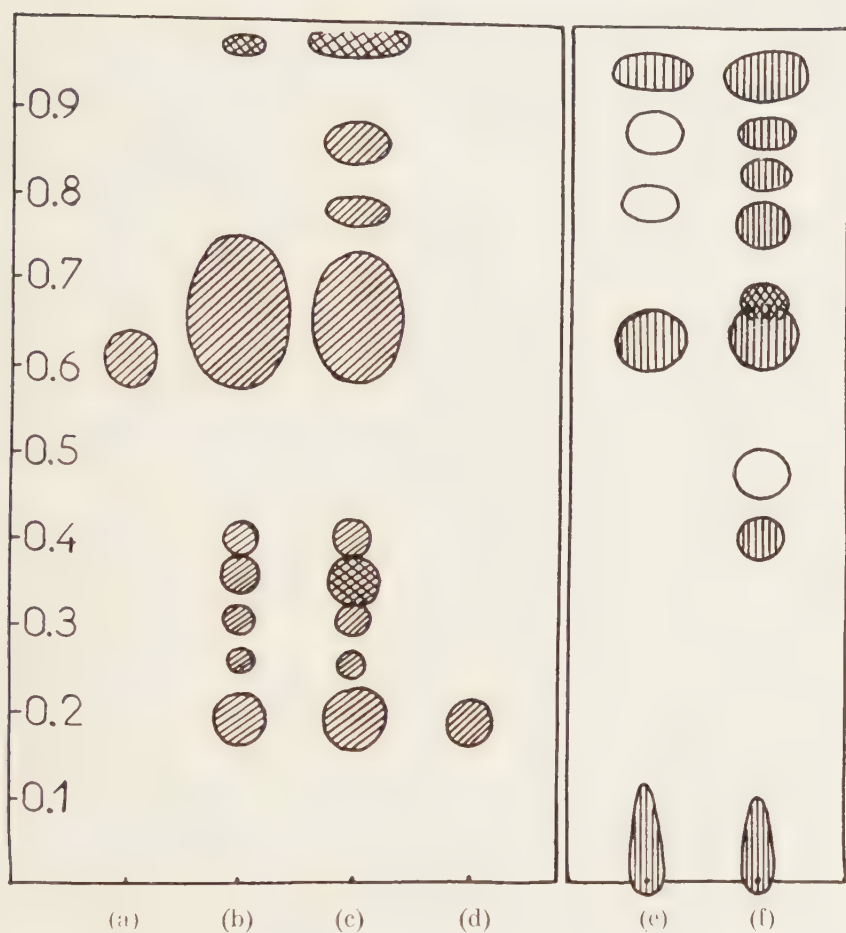


Fig. 9. — *Essences d'Eucalyptus et de Niaouli* (Chromatoplaques).

A. — *Composés oxygénés* (partie gauche) :

Solvant mobile : benzène-éther isoprop. = 80 : 20.

Révélateur : Vanilline sulfurique.

(a) : cinéol ; (b) : essence d'Eucalyptus ; (c) : essence de Niaouli ; (d) : α -terpinéol.

B. — *Hydrocarbures* (partie droite) :

Solvant mobile : hexane.

Révélateur : trichlorure d'antimoine.

(a) : ess. d'Eucalyptus ; (b) : ess. de Niaouli.

3) Chromatographie après mercuration

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURATION :

	α -pinène	Essence	
		(A)	(B)
{ Produits	0,01 ml	0,05	0,05
{ Réactif.....	0,75	0,25	0,50
{ Méthanol.....	0,25	0,75	0,50
MICRODÉPOTS.....	2 μ l	3 μ l	3 μ l

Résultats

Témoins	Essence		Interprétation
	a)	b)	
α -pinène : 0,14	— 0,25 +++ 0,34 0,44 0,63 (Cm) $\pm$ 0,71 $\pm$	0,14 ++ 0,25 +++ 0,34 0,44 0,63 (Cm) —	
Ion mercurique : 0,90 —		(Hg + + : 0,90)	Hg + + en excès

Le cinéol n'étant pas mercuro-soluble, ne peut être mis en évidence par cette technique.

Conclusion :

Le cinéol, constituant principal de l'essence, est facilement mis en évidence sur plaque ; la tache bleue obtenue après révélation sulfo-vanillique est large et intense.

Sur chromatoplaque, avec les deux solvants, l'essence d'Eucalyptus est assez facilement différenciable de celle de Niaouli (voir plus loin).

Les opérations de purification ou de rectification éliminent de ces deux essences un certain nombre de constituants — carbonyles notamment — d'où leur absence sur les chromatogrammes.

ESSENCE DE GIROFLE

ORIGINE

Essence retirée des boutons floraux du Giroflier, *Eugenia caryophyllata* Thunb., Caryophyllacées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : α et β -caryophyllènes (5 à 12 pour cent).

Alcools : alcools méthylique, 2-heptylique, 2-nonylique, méthylfurfurylique, benzylique.

Aldéhydes : furfural, α -méthylfurfural, vanilline.

Cétones : méthyl-n-heptylcétone.

Esters : acétyleugénol (10 à 15 pour cent).

Phénols : eugénol (70 à 90 pour cent).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : 3 essences commerciales de clous et 2 essences de feuilles.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c).

Liquide mobile : benzène — éther isopropylique : 80 — 20.

Durée du développement : 1 h 30 mn.

Température : 23°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	Vanilline H ₂ SO ₄	O.D.A.	Interprétation
0,05	—	—	rg. oré (ch)	Eugénol (T. : 0,64)
0,09	bl. cl.	bl. g.	rg. oré	
0,16	bl. cl.	—	—	
0,25	—	g. bl.	—	
0,30	—	mv. ±	—	
0,33	—	bl. g.	—	
0,37	—	mv.	vi. (fc.)	
0,54	—	rs. gt. ±	—	
[0,64] 0,69	—	oc. + + + +	—	
0,83	—	rs. ±	—	
0,91	—	j. br. ± (fc.)	—	Hydrocarbures (caryophyllènes)
0,94	—	vi.	—	

L'eugénol donne une tache ocre très nette avec la vanilline sulfurique (Rf : 0,69). A noter qu'avec ce solvant, celle de l'acétyl-eugénol (caractéristique de l'essence officinale de clous de Girofle, absente de l'essence de feuilles), n'est pas distincte. Pourtant, avec les silices Merck ou Fluka, l'acétyleugénol donne une tache en croissant, coiffant celle de l'eugénol ; mais cet ester est facilement repéré, avec la silice habituelle, en modifiant le solvant (benzène 60-éther isopropylique 40) (Rf : 0,86).

Des traces de vanilline ont été décelées par l'O.D.A. (Rf 0,19) dans une essence ancienne.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 55 mn.

Température : 21°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,27	—	g. cl. ±	
0,39	g. rsé.	g. rsé.	α - caryophyllène ?
0,64	vi. mv.	g. mv.	β - caryophyllène ?
0,84	—	g. cl. ±	

Les chromatogrammes d'essences de clous et de feuilles paraissent comparables dans cet essai.

2) Papier à la paraffine chlorée (fig. 10)*Conditions opératoires*

Liquide mobile : acétone - eau : 60 - 40.

Parcours de la phase mobile : 177 mm.

Durée du développement : 4 h 45 mn.

Température : 21°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	KMn O ₄ Na ₂ CO ₃	D.B.Q.C.I. — CO ₃ Na ₂	Interprétation
0,06	—	br. ++	—	Caryophyllènes (T. : 0,06)
0,43	—	br. +++	—	Acétylégénol (T. : 0,43)
0,51	g. cl., i ₁	—	—	—
[0,65] 0,64	—	br. ++++	bl. vet.	Eugénol (T. : 0,65)
0,86	bl., i ₁₋₂	—	—	—

La tache 0,06 correspond aux caryophyllènes. On peut augmenter la valeur de ce Rf en choisissant un solvant mobile plus riche en acétone (70 - 30). Le témoin utilisé, constitué vraisemblablement par le mélange des deux caryophyllènes, donne une tache analogue.

L'acétylégénol est décelé ici sans difficulté.

Avec la D.B.Q.C.I., l'eugénol donne une tache bleu verdâtre pour un faible microdépôt (quelques microgrammes). Si la tache est de grande dimension, seule la périphérie présente cette couleur, la zone centrale étant jaune.

3) Chromatographie après mercuration (fig. 11)*Conditions opératoires*

MILIEUX DE MERCURATION

	Acétylégénol	Eugénol	Essence
Produits..	0,01 ml	0,01	0,01
Réactif...	0,25	0,25	0,75
Méthanol.	0,75	0,75	0,25
MICRODÉPÔTS.	1 µl	1 µl	3 µl

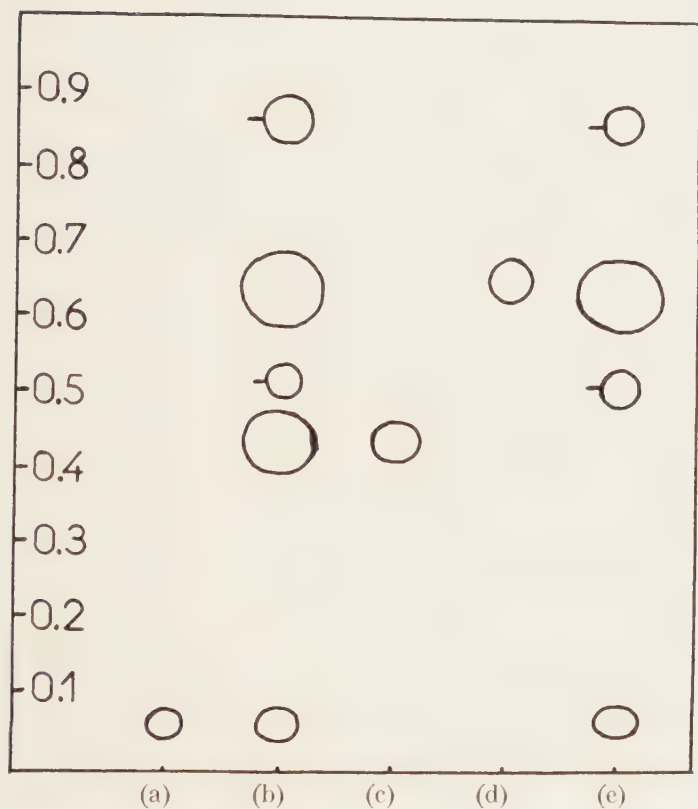


Fig. 10. — *Essences de Girofle* (clous et feuilles).

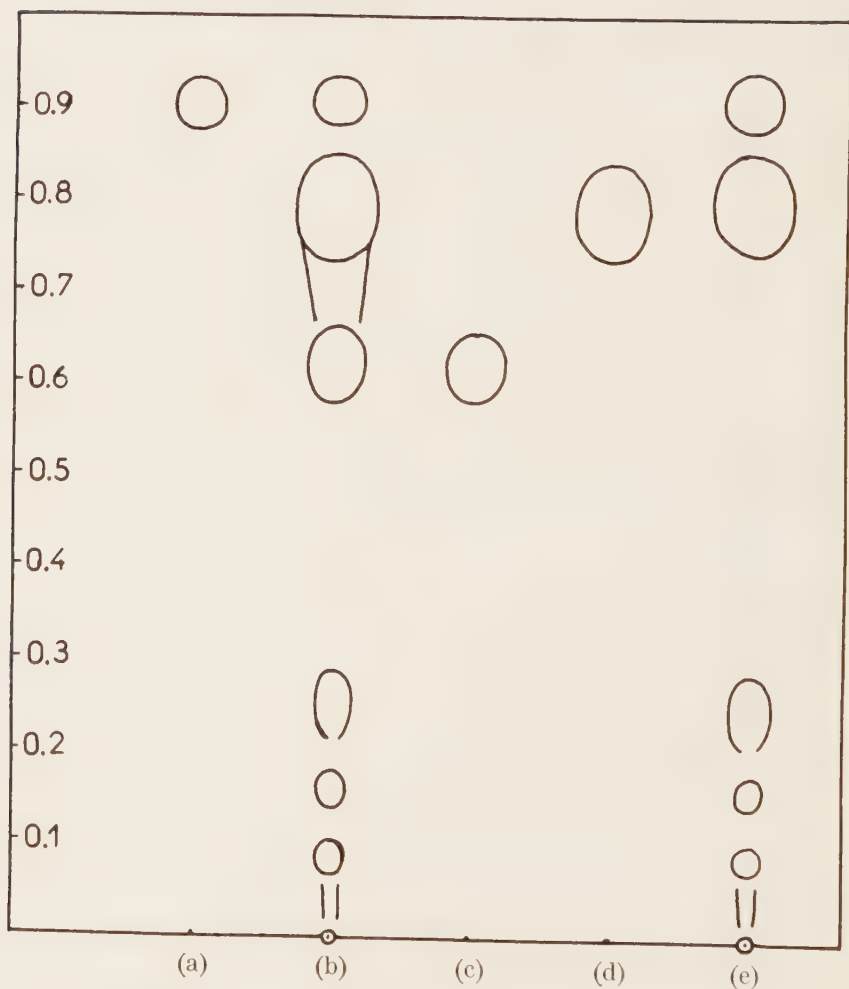
Chromatographie sur papier hydrofugé par la paraffine chlorée.

Solvant mobile : acétone - eau = 60 : 40.

Révélateur : KMnO_4 - Na_2CO_3 .

(a) : caryophyllènes ; (b) : ess. de clous de Girofle ; (c) : acétyleugéno ; (d) : eugénol ; (e) : essence de feuilles de Girofle.

Fig. 11. — *Essences de Girofle* (clous et feuilles). Chromatographie sur papier après mercurisation.



	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Acét. de Hg++					
0,1 M dans le Méthanol	0,05 ml	0,75	0,25	0,25	0,75
Produits	—	0,01 ml	0,01	0,01	0,01
Méthanol	1 ml	0,25	0,75	0,75	0,25
Microdépôts	1 μ l	3 μ l	1 μ l	1 μ l	3 μ l

Produits. (a) : ion mercurique ; (b) : ess. de clous ; (c) : acétyleugénol ; (d) : eugénol ; (e) : ess. de feuilles.

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
—	0,09	
—	0,16	
—	0,25	
Acétyl Eugénol : 0,63	0,63 + + +	Acétyl Eugénol
Eugénol : 0,80	0,80 + + + +	Eugénol
Ion mercurique : 0,91	(Hg + + : 0,91)	Hg + + en excès

Le mélange témoin de caryophyllènes (utilisé précédemment) donne trois taches identiques aux trois premières.

L'acétyl Eugénol et l'eugénol sont aussi nettement caractérisés.

L'essence de feuilles ne présente pas la tache de l'acétyl Eugénol.

Conclusion :

Les essences de clous ou de feuilles donnent des chromatogrammes caractéristiques pour chacune des trois techniques proposées.

La caractérisation de l'acétyl Eugénol, présent seulement dans l'essence de clous, permet une différenciation commode.

ESSENCE DE LAVANDE**ORIGINE**

Essence retirée des sommités fleuries de la Lavande officinale, *Lavandula vera* D.C., Labiées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : traces de dipentène, de Δ^3 -carène, d' α -pinène, β -myrcène (0,1 pour cent), β -ocimène, β -caryophyllène (2,9 pour cent).

Alcools libres : (28 à 46 pour cent) : alcool amylique, l-linalol, géraniol, nérol, d-bornéol (1,8 à 4,6 pour cent), lavandulol : $C_{10}H_{18}O$ (moins de 1 pour cent).

Aldéhydes : furfural, aldéhyde valérianique.

Cétones : éthyl-n-amylcétone.

Esters : esters acétique, butyrique, valérianique, caproïque du géraniol et du linalol.

L'acétate de linalyle est le constituant principal : 35 à 55 pour cent.

Le bornéol et le lavandulol sont également présents à l'état d'esters acétiques.

Composants divers : Cinéol, coumarine (0,8 pour cent).

Travaux à consulter : NAVES et coll. (1945, 1959, 1960 a, b, c, d, 1961).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : 5 échantillons commerciaux.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 12)

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c).

Liquide mobile : chlorure de méthylène - éther isopropylique
= 90 — 10.

Durée du développement : 1 h 25 mn.

Température : 21°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	Vanilline sulfurique	O.D.A.	Interprétation
0,09	±	g. bl.		
0,16		olive		
0,19		olive		
0,23		bl.		
0,28		—	j. brt	
0,31		bl. +	—	Bornéol (T. : 0,36)
0,36		bl. g. +	—	
0,39		bl.	br. (ch)	
0,51		—		Linalol (T. : 0,49)
[0,49] 0,52		bl. + + + +		
0,60			rgt.	Cinéol (T. : 0,64)
0,64		bl. +	rgt.	
0,67			jt. ±	acétate de linalyle (T. : 0,88)
0,71		mv.	—	
0,81		—	rs.	
0,89		bl. + + + +	—	
0,96		vi.		Hydrocarbures

Sont nettement caractérisés en vanilline sulfurique, le linalol et l'acétate de linalyle. Le bornéol et l'eucalyptol donnent des taches plus faibles. Celle donnée par le géraniol est incluse dans une autre, non identifiée, d'intensité plus forte (Rf : 0,31). Un autre solvant (hexane - acétate d'éthyle = 80 - 20) permet de séparer les deux taches. Celle du cinéol est plus importante avec l'essence de Lavandin et beaucoup plus encore avec celle de l'Aspic. C'est là un moyen de différenciation des trois essences mais, en ce qui concerne les essences de Lavande et de Lavandin, on peut prévoir des cas limites où les proportions de cinéol seraient voisines.

L'essence d'Aspic donne une tache très sensiblement plus faible pour l'acétate de linalyle, par contre celle de Rf 0,31 est d'intensité plus forte.

La caractérisation du camphre dans les essences de Lavandin et d'Aspic, apporterait un précieux moyen de différenciation, mais cette substance est très difficile à révéler en présence des autres constituants. La chromatographie en phase gazeuse (NAVES, 1959), ou même la détermination à l'état de semicarbazone selon la méthode de KAISTHA (1956) apportent une solution à ce problème.

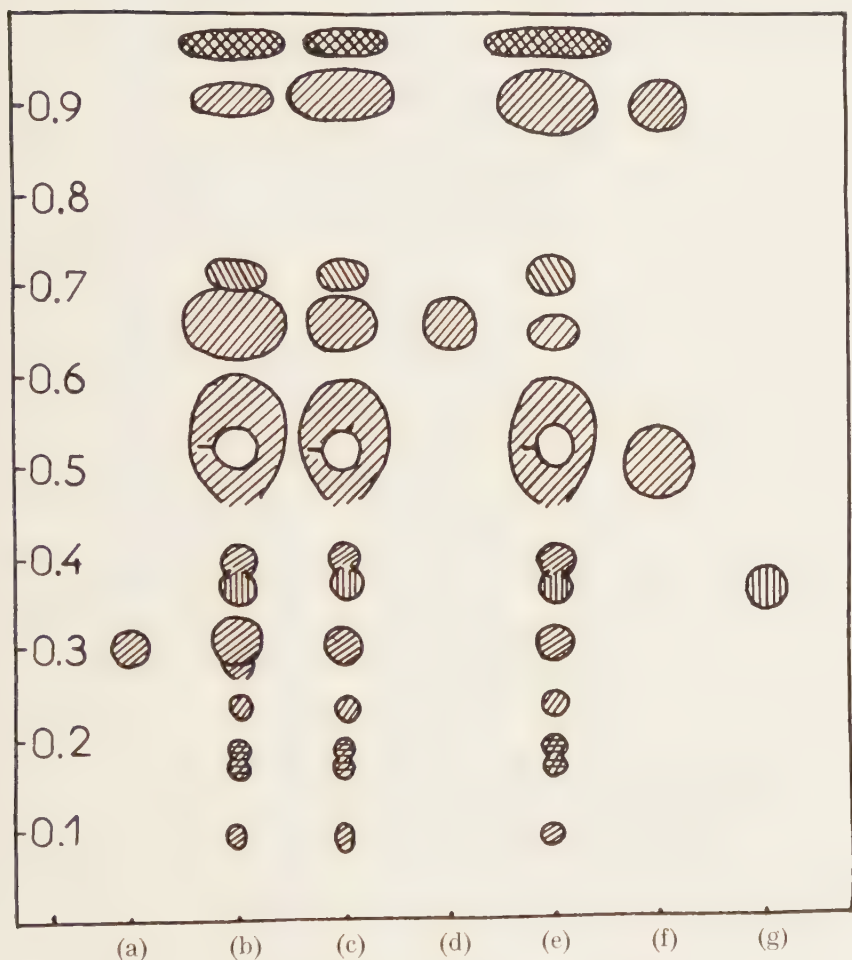


Fig. 12. — *Essences de Lavandes*. (Chromatoplaque).

Solvant mobile { chlorure de méthylène 90
 éther isopropylique 10
 Révélateur : Vanilline sulfurique.

(a) : α - terpinéol ; (b) : ess. de L. Aspic ; (c) : ess. de Lavandin ; (d) : cinéol ;
 (e) : ess. de Lavande off. ; (f) : linalol (bas) ; acétate de linalyle (haut) ; (g) : bornéol.

En diminuant la concentration en éther isopropylique, on peut faire apparaître deux nouvelles taches de faible intensité et situées de part et d'autre de celle d'acétate de linalyle.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 55 mn.

Température : 21°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,39	g. rsé	sa.	β-caryophyllène ?
0,58	g.	cr.	
0,65	vi. mv. +	g. mv.	
0,76	—	bg.	
0,85	g.	bg.	T. α-pinène : 0,92
—	—	—	

Les chromatogrammes obtenus avec les essences de Lavande, Lavandin et Aspic, sont identiques. Toutefois l'essence d'Aspic donne une tache supplémentaire au niveau de celle de l'α-pinène.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau = 60 - 40.

Parcours de la phase mobile : 182 mm.

Durée du développement : 4 h 40 mn.

Température : 21°.

Résultats

Rf	KMnO ₄ Na ₂ CO ₃	O.D.A.	Interprétation
0,04	br. +	—	Sesquiterpènes ?
[0,20] 0,19	br. + + +	—	
0,38	—	rs. gt.	Acétate de linalyle (T. : 0,20)
[0,58] 0,57	br. + + + +	—	Linalol (T. : 0,58)
0,63	—	rs. gt.	

La tache fluorescente (observée sur plaque au Rf 0,51) n'est pas visible ici. Avec l'essence d'Aspic, on note une tache de même Rf que celle de l'α-terpinéol (Rf : 0,65) et une tache très faible pour l'acétate de linalyle.

3) Chromatographie après mercuration

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURISATION

	Limonène	Linalol	Essence
Produits	0,01 ml	0,01	0,01
Réactif	0,50	0,25	0,75
Méthanol	0,50	0,75	0,25
MICRODÉPOTS	1 μ l	1 μ l	1 μ l

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
	0,09	
	0,16	
Limonène (a) : 0,25	0,24	Hydrocarbures (Caryophyllène)
	0,36	
Linalol (a) : 0,46	0,46 + + +	Linalol
Limonène (b) : 0,65 (Cm)	0,64 (Cm)	
Linalol (b) : 0,78	0,78 + + +	Linalol
Ion mercurique	(Hg + + : 0,90)	Hg + + en excès

Cette technique offre peu d'intérêt pour la différenciation des trois essences.

Les chromatogrammes obtenus avec l'essence de Lavande sont comparables à ceux de l'essence de Bergamote. Toutefois, pour celle-ci, les deux premières taches sont, d'une façon générale, moins distantes entre elles (Rf 0,11 et 0,16).

Conclusion :

Les constituants principaux de l'essence de Lavande sont identifiés. Relativement à l'essence de Lavandin, celle de Lavande accuse, sur chromatoplaque, une teneur sensiblement moins élevée en cinéol ; mais cette distinction n'est peut-être pas absolue. Quant à l'essence d'Aspic, elle est nettement plus riche en cinéol que les deux autres. La présence du camphre dans les essences de Lavandin et d'Aspic étant caractéristique, la détermination de cette cétone à l'état de semicarbazone ou par chromatographie en phase gazeuse, apporte une solution nette à ce problème.

ESSENCE DE LAVANDIN

ORIGINE

Essence retirée des sommités fleuries du Lavandin (*Lavandula hybrida* Rev. = *Lavandula vera* D.C. $\times$ *Lavandula latifolia* Chat.) par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : d et l α -pinène, d et l-camphène, l-limonène et dipentène, sesquiterpènes, ocimène et allo-ocimène.

Alcools : d-bornéol, l α -terpinéol, géraniol, l-lavandulol, nérol, linalol (43-44 pour cent).

Aldéhydes.

Cétones : d-camphre (2,3 à 8 pour cent).

Esters : acétate de linalyle (16 à 28 pour cent), acétates d'octyle et d'hexyle.

Oxydes : cinéol, époxylinolol.

Traces de phénols, lactones, acides libres.

Travaux à consulter : NAVES (1945, 1959).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX (fig. 12)

Produits étudiés : trois échantillons commerciaux.

Pour les trois échantillons essayés, les résultats obtenus sont très voisins de ceux exposés pour l'essence de Lavande quelles que soient les techniques utilisées, sur plaque ou sur papiers. Cependant en ce qui concerne la tache du cinéol, elle est généralement plus importante (cf. essence de Lavande).

Etant donné que les Lavandins sont des hybrides à prédominance de l'un ou de l'autre des deux géniteurs, *Lavandula vera* et *Lavandula latifolia*, il est possible que d'autres échantillons soient beaucoup plus riches en cinéol et en terpinéol, et par suite se rapprochent davantage de l'essence d'Aspic.

ESSENCE DE MENTHE POIVRÉE

ORIGINE

Essence retirée des feuilles et sommités fleuries de la Menthe poivrée, *Mentha piperita* L., Labiées (*M. vididis* L. $\times$ *M. aquatica* L.) par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : α -pinène, p-3-menthène (?), phellandrène, limonène, cadinène.

Alcools : menthol, alcool isoamylique, hydrate de trans-sabinène.

Aldéhydes : aldéhydes acétique, isovalérique.

Cétones : menthone (9 - 12 pour cent), une menthénone, pipéritone, jasmone, pulégone, carvone.

Esters : (au maximum 21 pour cent) : acétate et isovalérianate de menthyle ; sulfure de diméthyle dans certaines essences.

Acides libres : acides acétique, isovalérianique.

Composants divers : cinéol, menthofurane (4-5-6-7-tétrahydro- 3-6-diméthylcoumarone), thymol.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : 3 essences Mitcham dont une originaire de Ribécourt¹.

1. Nous devons cette essence à l'obligeance des Établissements de Ricqlès que nous sommes heureux de remercier ici.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 13)

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c).

Liquide mobile : Benzène, éther isopropylique : 80 - 20.

Durée de développement : 1 h 20 mn.

Température : 22°.

Résultats obtenus

Rf	Vanilline H ₂ SO ₄	D.N.P.H. H ₂ SO ₄	Interprétation
0,16	bl. +		
0,20	bl.		
0,23	bl.		
[0,33] 0,35	bl. + + + +		Menthol (T. : 0,33)
0,44	bl.	br. jt (ch)	
0,47	rgt.		
0,51	bl.		
0,62	bl. + +	br. jt (ch)	Cinéol (T. : 0,62)
0,66	bl. vié. ±		Carvone? (T. : 0,66)
0,68	bl. ve.	j. +	
0,79	rs. (fc)		Thymol (T. : 0,79)
0,85	bl. ve. + +	j. + +	Menthone (T. : 0,85)
0,89	bl. + +		Acétate de menthyle (T. : 0,89)
0,94	rs (fr)		Menthofurane (T. : 0,94)
0,95	bi	br. (chd)	Hydrocarbures

Les chromatogrammes sont très caractéristiques : la vanilline sulfurique révèle 5 taches principales : menthol (bleu), cinéol (bleu), menthone (bleu-vert), acétate de menthyle (bleu) et menthofurane (rose).

La tache de menthofurane chevauche avec celle des hydrocarbures ; toutefois elle apparaît seule avec le réactif sulfovanillique utilisé à froid.

La tache 0,66 semble correspondre à la carvone. Elle est de faible intensité et n'est pas constamment visible lors de chaque révélation.

La tache 0,79, correspondant au thymol, a également été mise en évidence par la D.B.Q.C.I.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 1 h.

Température : 20°.

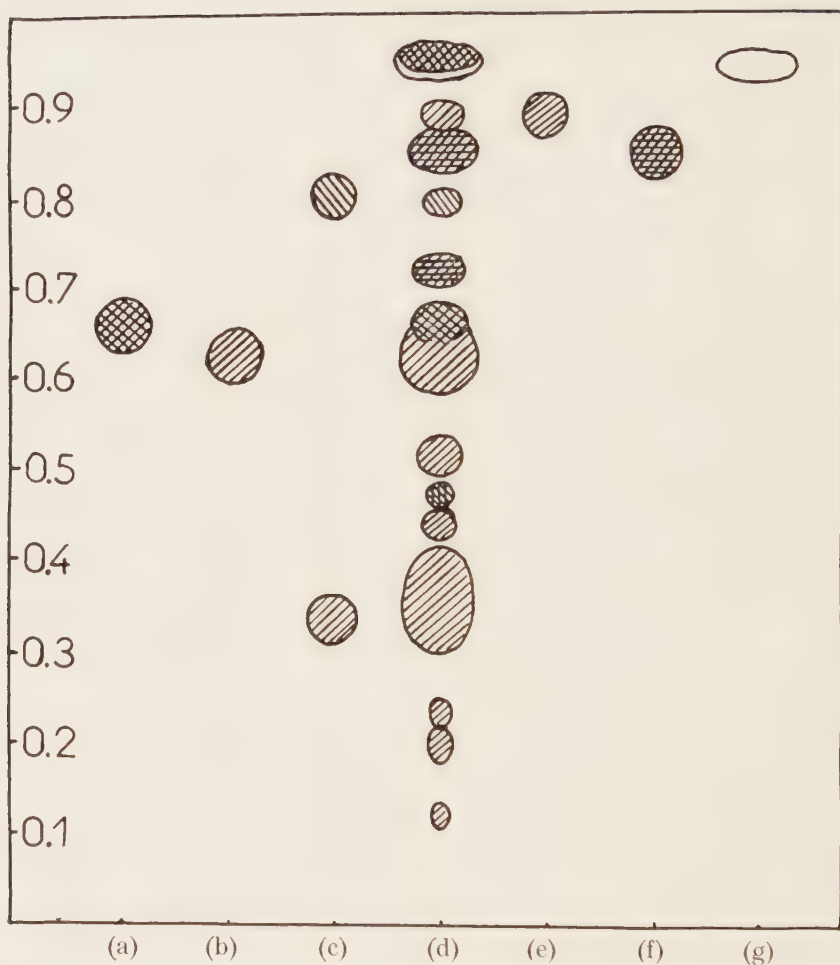


Fig. 13. — *Essence de Menthe poivrée* (Chromatoplaque).

Solvant mobile $\left\{ \begin{array}{l} \text{benzène} \dots\dots\dots 80 \\ \text{éther isopropylique} \dots\dots\dots 20 \end{array} \right.$
 Révélateur : vanilline sulfurique.

(a) : carvone ; (b) : cinéol ; (c) : menthol (bas), thymol (haut) ; (d) : ess. de *Menthe poivrée* ; (e) : acétate de menthyle ; (f) : menthone ; (g) : menthofurane (révélé en rouge à froid).

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,32	sa + +	oré + +	Menthofurane (T. : 0,32)
0,44	gt	g. cl.	
0,56	g.	g. cl.	
0,63	g. +	g. cl.	Limonène (T. : 0,63)
0,68	vi. mv.	g. rsé	
0,73	—	g. cl.	
0,89	—	g. cl.	T. α -pinène : 0,95
0,95	—	g. cl.	

L'acide trichloracétique à 4 pour cent p/v dans le chloroforme constitue un bon réactif de la révélation du menthofurane (KRUPSKI et FISCHER, 1950) ; à froid et après quelques minutes, on observe une tache rose.

Ce composé hétérocyclique a été mis en évidence dans toutes les essences essayées.

2) **Papier à la paraffine chlorée**

Aucune tache n'est observée selon cette technique.

3) **Chromatographie après mercuration***Conditions opératoires*

MILIEUX DE MERCURATION

	Limonène	Essence	
		(A)	(B)
Produit	0,01 ml	0,04	0,04
Réactif	0,25	0,40	1
Méthanol	0,75	0,60	0,25
MICRODÉPOTS	1 μ l	3 μ l	3 μ l

Résultats

Témoins	Essence		Interprétation
	(A)	(B)	
	0,09		
	—	0,13	
	—	0,18	
Limonène : 0,25 (a)	0,25 + +	—	Limonène
	—	0,30	
	0,35	—	
	0,46	—	
Limonène : 0,64 (b) (Cm)	0,63 (Cm) + +	0,63 (Cm) + +	Limonène
Hg + + 0,91	(Hg + + : 0,91)	(Hg + + : 0,91)	
			Hg + + en excès

Le menthol (précipité par l'acétate mercurique, d'où la nécessité d'un excès de ce réactif) et la menthone, ne sont pas caractérisés par cette méthode.

Des taches différentes sont mises en évidence suivant les proportions du réactif.

Conclusion :

En chromatoplaques, les constituants de l'essence de Menthe officinale ont été nettement mis en évidence. Parmi eux, il faut signaler le menthofurane¹, dont l'identification est intéressante, car il est caractéristique de l'essence de *Mentha piperita* ; il n'a pas encore été trouvé dans l'essence de *Mentha arvensis*. De plus, comme l'ont montré en particulier les travaux de LEMLI (1955, 1963), la teneur en menthofurane dans la Menthe poivrée est très variable suivant l'âge de la plante (de 10 pour cent dans l'essence des feuilles jeunes à moins de 1 pour cent dans l'essence de la plante récoltée au moment de la floraison). Elle est très élevée chez les plantes parasitées (Menthe « basiliquée »).

ESSENCE DE NIAOULI

ORIGINE

Essence retirée des feuilles fraîches de *Melaleuca viridiflora* Soland, Myrtacées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : α -pinène droit.

Alcools : α -terpinéol, viridiflorol.

Aldéhydes : Aldéhydes benzoïque, valérique.

Esters : acétate, butyrate, valérianate de terpinyle.

Ethers-oxydes : cinéol (40 à 60 pour cent),

Composés soufrés

Dans l'essence purifiée, certains constituants, aldéhydiques et soufrés notamment, sont éliminés.

Travaux à consulter : HELLYER et MAC KERN (1955).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : quatre échantillons d'essence purifiée².

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig.9)

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c).

Liquide mobile : benzène : 80, éther isopropylique : 20.

Durée du développement : 1 h 25 mn.

Température : 23°.

1. Nous sommes heureux d'adresser nos remerciements à M. DITZ, Directeur technique des Établissements Benard et Honnorat — Méro et Boyveau (Grasse), qui nous a très aimablement procuré un échantillon de Menthofurane pur.

2. Trois d'entre eux sont dus à l'obligeance du Dr F. PREVET que nous remercions ici.

Résultats

Rf	Vanilline H ₂ SO ₄	Interprétation
0,19	bl. ++	α - terpinéol (T. : 0,19)
0,24	bl. mv.	
0,30	bl.	
0,34	g. mv. ++	
0,39	bl.	
[0,60] 0,65	bl. + + + +	Cinéol (T. : 0,60)
0,77	bl.	
0,86	bl.	
0,97	vi.	Hydrocarbures

Une tache importante (Rf 0,65) correspond au cinéol. La tache 0,77 est quelquefois peu visible sur le fond bleu obtenu après révélation avec la vanilline sulfurique (proximité de la grande tache du cinéol). Le réactif au trichlorure d'antimoine donne en ce cas une révélation plus sûre (tache gris rosé en lumière de Wood).

La tache de Rf 0,34, gris mauve après vanilline sulfurique, semble surtout caractéristique de l'essence de Niaouli (elle n'existe pas dans celle d'Eucalyptus par ailleurs assez analogue bien que fournissant un nombre moins constant de taches).

B. — HYDROCARBURES (fig. 9)

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 1 h.

Température : 20°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,40	g.	g. cl.	α — pinène (T. : 0,95)
0,48	—	g. cl.	
0,64	g. ++	g. cl.	
0,68	vi. mv.	bg.	
0,77	g. mv.	bg.	
0,83	g.	g. cl.	
0,88	g.	g. cl.	
0,95	g.	g. cl.	

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau : 65 - 35.

Parcours de la phase mobile : 183 mm.

Durée du développement : 5 h.

Température : 22°.

Résultats

Rf	KMnO ₄ - Na ₂ CO ₃	Interprétation
0,06 0,71	br. br. ++	Sesquiterpènes ? α-terpinéol (T. : 0,71

Le cinéol ne possède pas de double liaison ; il n'est pas révélé par le permanganate de potassium en milieu alcalin. Le terpinéol est caractérisé, ainsi qu'un terpène de poids moléculaire plus élevé.

3) Chromatographie après mercuration*Conditions opératoires*

MILIEUX DE MERCURATION

	α-pinène	α-terpinéol	Essence
Produits	0,01 ml	0,01	0,05
Réactif	0,50	0,50	0,75
Méthanol	0,50	0,50	0,25
MICRODÉPOTS	2 µl	1 µl	2 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
α-pinène : 0,14	0,09 0,14++ 0,26 0,34 0,65 (Cm)	
α-terpinéol : 0,81	0,81++	
Ion mercurique : 0,90	(Hg++ : 0,90	Hg++ en excès

Seuls l'α-terpinéol et l'α-pinène sont mis en évidence.

Conclusion :

On caractérise aisément le cinéol en chromatoplaques. Aucun composé carbonylé n'a été mis en évidence par les réactifs essayés (D.N.P.H. et O.D.A.), dans les essences rectifiées étudiées.

Sur la plaque (A) la tache de Rf : 0,34, par sa coloration gris-mauve, paraît caractéristique de l'essence de Niaouli. Les taches 0,77 et 0,86 paraissent absentes dans l'essence d'Eucalyptus.

La tache du terpinéol est plus nette pour l'essence de Niaouli en chromatoplaque.

Chacune des trois méthodes permet d'éviter la confusion avec l'essence d'Eucalyptus ; cependant, s'il paraît relativement aisé de détecter l'addition d'essence de Niaouli à une essence d'Eucalyptus, l'inverse semble difficile par les seules méthodes chromatographiques.

ESSENCE D'ORANGE DOUCE

(dite de Portugal)

ORIGINE

Essence retirée de la partie externe du péricarpe du fruit frais de l'Oranger doux, *Citrus aurantium* Risso, Rutacées, par expression.

COMPOSITION

Hydrocarbures : d-limonène (90 pour cent), myrcène (<2 pour cent), α -pinène (<0,7 pour cent), sabinène (<0,7 pour cent).

Alcools : linalol droit, un alcool terpénique en C₁₀ étroitement apparenté au linalol, terpinéol, alcools octylique, nonylique.

Aldéhydes : n-nonanal, n-décanal (1 à 3 pour cent), citral, citronellal (?).

Acides : acides formique, acétique, caprylique, caprique.

Un composé amorphe.

Travaux à consulter : SWISHER (1962).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produit étudié : un échantillon commercial.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS (fig. 8)

Conditions opératoires

Acide silicique : Camag D 5 (c).

Liquide mobile : chlorure de méthylène, éther isopropylique : 93 - 7.

Durée du développement : 1 h 15 mn.

Température : 22°.

Résultats

Rf	Vanilline - H ₂ SO ₄	O.D.A.	Intrerpétation
0,21	bl. +		T. α -terpinéol : 0,21
0,25	j. ve. (Wood)		
0,28	g. vié.		
0,37	bl. ++		Linalol (T. : 0,37)
0,49	bl. +	j. +	Citrals (a+b) (T. : 0,49)
0,58	g. vié.		
0,67	bl.		
0,69	g. bl.		
0,77	g. mv. ++		Aldéhydes (T. n-décanal : 0,77)
0,95	bl. ±		Hydrocarbures

Aucune tache n'est très importante : on met en évidence un peu de terpinéol, de linalol, de citral. En outre la tache de Rf 0,77,

révélée en gris-mauve par la vanilline sulfurique, est bleue avec la M.B.T.H. — Fe Cl_3 (Méthode de SAWICKI), ce qui indique sa nature aldéhydique aliphatique. Il s'agit sans doute d'un mélange des aldéhydes nonylique et décylque, principalement responsables de l'arôme caractéristique de l'Orange.

N. B. — Sur la figure 8, l'essence a été chromatographiée avec un solvant mobile à 10 pour cent d'éther isopropylique (même remarque que pour l'essence de Citron).

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 40 mn.

Température : 25°.

Résultats

Rf	Sb Cl_3 visible	Sb Cl_3 Wood	Interprétation
[0,66] 0,72	g. + + + +	cr. + + + +	Limonène (T. : 0,66)

Le limonène est très nettement caractérisé.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau : 50 - 50.

Parcours de la phase mobile : 180 mm.

Durée de développement : 5 h 15 mn.

Température : 20°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	O.D.A.	Interprétation
0,19	j. cl.	—	Citrals (a+b) (T. : 0,20)
0,20	—	j. +	
0,24	j. cl.	—	
0,33	j. cl.	—	
0,40	j. cl.	—	

La lumière de Wood fait apparaître ici des taches fluorescentes.

Le permanganate de potassium en milieu alcalin n'a donné aucune tache.

Le limonène n'est pas caractérisé.

Le citral donne une tache faible avec l'o-dianisidine.

3) Chromatographie après mercuration

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURATION

	Limonène	Essence
Produits.....	0,01 ml	0,01
Réactif.....	0,50	0,75
Méthanol.....	0,50	0,25
MICRODÉPOTS.....	1 µl	3 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
(Limonène (a) : 0,26	0,26 + + + + 0,33 ±	Limonène
Limonène (b) : 0,66 (Cm) Ion mercurique : 0,90	0,65 (Cm) + + + +	Limonène

Seul le limonène est pratiquement mis en évidence.

Conclusion :

Les techniques sur plaque et sur papier après mercuration, mettent bien en évidence le limonène ainsi que sa concentration élevée dans l'essence. Sur plaque, on caractérise le linalol et le citral.

En outre, les aldéhydes nonylique et décylique ne donnant qu'une tache, sont décelés, soit par la vanilline sulfurique, soit par la M.B.T.H. — FeCl_3 .

ESSENCE DE PERSIL

ORIGINE

Essence retirée des fruits du Persil, *Petroselinum sativum* Hoff., Ombellifères, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : α -pinène, pétrosilane (P.F. = 69 °C).

Aldéhydes.

Cétones.

Ethers oxydes : Apiol (constituant principal) : éther méthylénique 3-4 et diméthylque 2-5-de l'allyle apionol.

Myristicine : éther méthylénique-3-4 et méthylque 5 de l'allyle apionol.

l-allyle 2, 3, 4, 5-tétraméthoxybenzène.

Acides : palmitique (traces).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Deux échantillons étudiés : (1) commercial.

(2) préparé au laboratoire.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS

Conditions opératoires

Acide silicique : Fluka (lot 1).

Liquide mobile : chlorure de méthylène - éther isopropylique :
97 - 3.

Durée du développement : 1 h 30 mn.

Température : 24°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	Vanilline H ₂ SO ₄	D.N.P.H.	O.D.A.	Interprétation
0,07	—	g.	—	—	
0,08		g. cl., i ₁			
0,11		g., i ₁			
0,14		bl., i ₁			
0,19	j. ve., i ₁	bl			
0,22		bl., i ₁			
0,26		bl. mv., i ₁			
0,29		bl. g., i ₁			
0,33	bl., i ₁	g. mv.	oré., i ₁	br. rgt., i ₁	
0,36	bl., i ₁	bl. i ₁			
0,38		mr.			
0,44		rs. mv., i ₁			
0,47	bl			jt., i ₁	
0,52		(U.V. : blé)		brt., i ₁	
0,55		g. bl.			
0,60		jt.		j. cl	
0,66		bl.			
0,72		mr.+++			
0,82		g. rg.++++			
0,93		vi.			
					Apiol (T. : 0,72)
					Hydro- carbures

Le nombre des taches révélées dans l'essence (1) est assez élevé : elle paraît surannée.

Une tache révélée par la vanilline en marron correspond à l'apiol.

Une tache plus grosse, gris rougeâtre, n'a pas été identifiée (myristicine?).

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 40 mn.

Température : 25°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,31	—	bg. ± i ₁	
0,42	gt. +	g. cl.	
0,51	—	g. cl. ±	
0,63	g. i ₁	g. cl.	
0,66	vi. mv., i ₁	vi. mv.	
0,81	gt.	bg. cl.	
0,90	g. mv.	g. cl.	
0,95	g. mv.	g. rg. +	

L'essence (1) paraît plus riche en certains composants, dont aucun n'a pu être identifié.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau : 65 - 35.

Parcours de la phase mobile : 182 mm.

Durée de développement : 5 h.

Température : 22°.

Résultats

Rf	Lumière de Wood	KMnO ₄ Na ₂ CO ₃	D.N.P.H.	O.D.A.	Interprétation
0,18		br. ±			Apiol (T. : 200 µg. : 0,35)
0,34		br. + + + + +			
0,45		br.			
0,49		br., i ₁			
0,60	bl., i ₁		j., i ₁	rs. gt. + i ₁	
0,72				rs. gt. + i ₁	

L'apiol est révélé par le permanganate et également par la technique d'ILLARI et COGHI (1957) : pulvérisation d'eau de brome suivie d'un séjour à l'étuve à 110° pendant une 1/2 heure. On observe en lumière de Wood une fluorescence jaune très sensible (2 µg). La tache de Rf 0,45 est révélée également par cette technique.

3) Chromatographie après mercurisation

Conditions opératoires

MILIEUX DE MERCURISATION

	α-pinène	apiol	Essence
Produits.....	0,01 ml	0,01 g	0,02
Réactif.....	0,75	0,25	0,75
Méthanol.....	0,25	0,50	0,25
MICRODÉPOTS.....	2 µl	1 µl	3 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
α -pinène : 0,14	0,11 0,15 0,25 0,35	
Apiol : 0,52	0,52 + + + + 0,60 0,71 0,79 ±	Apiol
Ion mercurique : 0,90	(Hg + + : 0,90)	Excès de Hg +

L'apiol est nettement caractérisé.

Conclusion :

L'apiol est nettement caractérisé par les trois méthodes.

Des hydrocarbures sont mis en évidence sur chromatoplaque et par mercurisation.

Ne disposant pas d'un témoin de myristicine, nous n'avons pas été en mesure d'identifier cette substance avec certitude.

ESSENCE DE ROMARIN

ORIGINE

Essence retirée des sommités fleuries du Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., Labiées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : α -pinène, camphène, probablement un sesquiterpène (caryophyllène?).

Alcools : bornéol (8 à 16 pour cent).

Cétones : camphre (17 pour cent environ).

Esters : acétate de bornyle (1 à 5 pour cent).

Ethers-oxydes : cinéol (17 à 32 pour cent).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : deux échantillons commerciaux de provenance espagnole.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (b).

Liquide mobile : chlorure de méthylène : 95.
éther isopropylique : 5.

Durée du développement : 1 h 10 mn.

Température : 23°.

Résultats

Rf	Vanilline H ₂ SO ₄	Interprétation
0,19	bl. +	Bornéol T. : 0,33)
0,26	bl.	
0,29	rs.	
0,33	bl. g. ++	
0,40	bl.	Cinéol (T. : 0,48)
0,48	bl. ++ +	
0,55	mv.	
0,62	gt. ±	
0,68	rs (fc)	Acétate de bornyle (T. : 0,72)
0,72	bl. g. +	
0,79	g.	Hydrocarbures
0,95	vi.	

Ont été identifiés, parmi un grand nombre de taches assez faibles : le bornéol, le cinéol (tache la plus grosse) et l'acétate de bornyle.

B. — HYDROCARBURES*Conditions opératoires*

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 55 mn.

Température : 21°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,24	—	g. cl.	Caryophyllène ?
0,38	g. rsé.	sa.	
0,59	g.	cr.	
0,64	vi. mv.	g. mv.	
0,76	g.	g. cl.	
0,86	g.	g. cl.	α-pinène (T. : 0,92)
0,92	g. ++	g. cl. ++	

Les hydrocarbures sont abondants, notamment l'α-pinène.

2) Papier à la paraffine chlorée

Aucune tache n'est révélée avec cette technique.

3) Chromatographie après mercurisation*Conditions opératoires***MILIEUX DE MERCURISATION**

	α-pinène	Essence
{ Produit.....	0,01 ml	0,02
{ Réactif.....	0,75	0,25
{ Méthanol.....	0,25	0,50
MICRODÉPOTS.....	2 µl	3 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
α -pinène : 0,14	0,08 0,13 + 0,22 0,28 0,57 (Cm)	α -pinène
Ion mercurique : 0,90	0,77 $\pm$ (Hg + + : 0,90)	Hg + + en excès

Conclusion :

L' α -pinène, le bornéol, le cinéol, l'acétate de bornyle ont été identifiés par chromatographie sur plaque.

La composition de l'essence ne mentionne pas de composé oxygéné à fonction éthylénique. Ce fait est confirmé par l'examen du chromatogramme obtenu après mercuration ; les taches sont en effet rassemblées dans le premier tiers du parcours de la phase mobile.

Le camphre qui serait un constituant assez abondant de l'essence, ne peut être mis en évidence par les techniques employées (cf essences de Lavande et de Lavandin).

ESSENCE DE ROSE**ORIGINE**

L'essence est retirée de *Rosa damascena* Mill., Rosacées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : sesquiterpènes azulénogènes, stéaroptène (6 à 20 pour cent).

Alcools : géraniol (40 à 50 pour cent) et β -citronellol (30 à 40 pour cent).

Aldéhydes : nonanal et les aldéhydes inférieurs et supérieurs, citral.
Cétones : carvone.

Esters (2,5 à 6 pour cent, en acétate de géranyle) : ceux des alcools mentionnés ci-dessus.

Ethers-oxydes : méthyl-eugénol, « rose-oxyde » (l-cis2(méthyl-1-propényl)-4 méthyltétrahydropyranne).

Phénols : eugénol (1 pour cent).

Acides : acétique et valériannique.

Travaux à consulter : IVANOV et coll. (1955-1956), PANAIOTOV et IVANOV (1958 a, b), PANAIOTOV et IVANOV (1959), SEIDEL et coll. (1959), (1961), IVANOV et coll. (1960).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produits étudiés : 2 échantillons commerciaux (Grasse).

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c).

Liquide mobile : chlorure de méthylène - éther isopropylique :
93 - 7.

Durée du développement : 1 h 15 mn.

Température : 20°.

Résultats

Rf	Vanilline H ₂ SO ₄	O.D.A.	D.B.Q.C.I.	Interprétation
[0,24] 0,24 [0,28] 0,32 0,39 0,43	bl. ++++ bl. ++++ bl. ++ bl.			Citronellol (T. : 0,24) Géranol (T. : 0,28) Linalol (T. : 0,39)
0,50	bl. ++	j. ++		Citrals (a + b) (T. : 0,50)
0,57 0,63 0,69 0,72	bl. g. bl. oc. j. ++ bl. ++		bl. vie.	Eugénol (T. : 0,69) Acétate de géranyle et autres esters (T. ac. de géranyle : 0,72)
0,80	g. mv. ++			Aldéhydes (T. ald. nonylique et décylique : 0,80)
0,84 0,91 0,95	bl. bl. ± vi.	(i)		Hydrocarbures

Sont caractérisés par cette méthode, avec la vanilline sulfurique, le citronellol (bleu) dont la tache est prolongée par celle du géranol (bleu), le linalol (bleu), le citral (bleu, et jaune après O.D.A.), l'eugénol (ocre clair), l'acétate de géranyle (bleu) mêlé à d'autres esters.

Les deux premiers alcools sont mieux séparés par le solvant hexane - acétate d'éthyle : 75 - 25.

La tache de Rf 0,80 semble de nature aldéhydique aliphatique : elle est révélée en bleu par la technique de SAWICKI (voir p. 42).

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 45 mn.

Température : 19°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,42	—	g. cl.	
0,51	—	bg. cl.	
0,60	g. vié.	bg. cl.	
0,76	g. vié.	bg	
0,80	—	g. cl.	
0,83	—	g. cl.	
0,87	g. mv.	oc cl.	
0,92	—	g. cl.	
0,95	—	g. cl.	

Aucun composant n'a été identifié.

2) Papier à la paraffine chlorée*Conditions opératoires*

Liquide mobile : acétone - eau : 60 - 40.

Parcours de la phase mobile : 178 mm.

Durée du développement : 4 h 40 mn.

Température : 21°.

Résultats

Rf	KKmO ₄ Na ₂ CO ₃	O.D.A.	D.B.C.Q.C.I. N ₂ aCO ₃	Interprétation
0,05	br. +	—	—	Sesquiterpènes ?
0,28	—	—	—	
0,38	—	j. gt. ++		Citrals (a + b) T. : 0,38)
[0,57] 0,55	br. +++	—		Citronellol (T. : 0,57)
[0,63] 0,61	br. +++	—		Géranol (T. : 0,63)
0,62	—	—	bl. ±	Eugénol (T. : 0,64)

La caractérisation du citronellol et du géranol est bonne avec une faible prise d'essai.

L'eugénol présente un léger retard par rapport au témoin (cf chapitre 3).

3) Chromatographie après mercurisation*Conditions opératoires*

MILIEUX DE MERCURISATION

	Citronellol	Géranol	Linalol	Eugénol	Essence
Produits	0,01 ml	0,01	0,01	0,01	0,04
Réactif	0,25	0,25	0,25	0,25	0,75
Méthanol. . . .	0,75	0,75	0,75	0,75	0,25
MICRODÉPOTS. 1 µl		1 µl	1 pl	1 µl	4 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
	0,09	
	0,29	
	0,36	
Linalol (a) : 0,46	0,45	
Géraniol (a) : 0,66	0,66	
Citronellol : 0,77		
Géraniol (b) : 0,78	0,78 + + +	
Linalol (b) : 0,78		
Eugénol : 0,80		
Ion mercurique : 0,90		
	(Hg + + : 0,90)	Excès d'Hg + +

Les séparations obtenues sont médiocres.

Conclusion :

La technique en couche mince permet de caractériser un assez grand nombre des composants de l'essence : citronellol, géraniol, linalol, citrals a et b, eugénol, esters des alcools terpéniques précédents, aldéhydes. Il est toutefois à signaler que le citronellol et le géraniol sont mieux séparés sur papier à la paraffine chlorée que sur plaque.

ESSENCE DE TÉRÉBENTHINE

ORIGINE

L'essence de térébenthine retirée en France de *Pinus pinaster* Sol., Conifères, par distillation avec de l'eau ou de la vapeur d'eau non surchauffée, est l'essence de térébenthine officinale.

COMPOSITION

L'essence est composée d'au moins 90 pour cent d'un mélange d' α -pinène (63 pour cent) et de β -pinène (27 pour cent) et par 10 pour cent au maximum de sesquiterpènes et de produits oxygénés.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Trois échantillons commerciaux ont été étudiés dont une essence birectifiée (3).

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS

Conditions opératoires

Acide silicique : D 5 Camag (c).

Liquide mobile : chlorure de méthylène — éther isopropylique
= 15-5.

Durée du développement : 1 h 10 mn.

Température : 22°.

Résultats

Rf	Vanilline H ₂ SO ₄	O.D.A.	Interprétation
0,19	bl.	—	Hydrocarbures
0,22	g. bl.	—	
0,25	g. bl.	—	
0,30	g. bl.	—	
0,39	g. bl., i ₁₋₃	g. vet., i ₁₋₃	
0,46	mv, i ₁₋₂	—	
0,50	g. bl.	g. vet.	
0,54	—	j., i ₁₋₂	
0,59	—	j., i ₁₋₃	
0,65	g.	—	
0,94	v., i ₁₋₂	—	

On obtient un grand nombre de petites taches. Elles correspondent à des composés oxygénés, et ne sont pas identifiées.

Les taches 0,46 - 0,54 - 0,94 sont absentes dans l'essence birectifiée (3).

Les pinènes α et β ne sont pas révélés ici.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 40 mn.

Température : 18°.

Résultats

Rf	Sb, Cl ₃ visible	Sb, Cl ₃ Wood	Interprétation
0,40	g. br., i ₁₋₂	bg, i ₁₋₂	β -pinène (T. 0,86) α -pinène (T. 0,94)
0,61	g. br., i ₁₋₂	bg.	
0,65	vi. mv., i ₁₋₂	vi. mv., i ₁₋₂	
0,86	g. br. +++	bg. ++++	
0,94	g. br. +++	bg. ++++	

L' α et le β pinène, constituants essentiels de l'essence, sont nettement caractérisés.

Les taches de Rf 0,40 et 0,61 sont absentes dans l'essence birectifiée (3).

Les résultats fournis par l'examen d'autres échantillons commerciaux sont identiques à ceux correspondant aux essences (1) et (2). Il en est de même en ce qui concerne l'étude des produits oxygénés.

2) Papier à la paraffine chlorée

Conditions opératoires

Liquide mobile : acétone - eau : 65 - 35.

Parcours de la phase mobile : 190 mm.

Durée du développement : 5 h.

Température : 20°.

Résultats

Rf	K-Mn O ₄ Na ₂ CO ₃	O.D.A.	Interprétation
0,06	br., i ₁₋₂		Sesquiterpène ?
0,20	br., i ₁₋₂		
0,56	br., i ₁	g., i ₁₋₂	
0,61	br., i ₁₋₃	g.	

Certaines taches sont absentes dans l'essence birectifiée.

3) Chromatographie après mercuration*Conditions opératoires*

MILIEUX DE MERCURATION

	α -pinène	β -pinène	Essence
Produits	0,01 ml	0,01	0,05
Réactif	0,75	0,50	0,25
Méthanol	0,25	0,50	0,75
MICRODÉPOTS	2 μ l	3 μ l	2 μ l

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
α -pinène 0,14	0,14 +	α -pinène
β -pinène 0,25	0,25 + + +	β -pinène
Ion mercurique 0,90	(Hg + + : 0,90)	Excès de Hg + +

L' α et le β -pinène sont mis en évidence.

N. B. — On peut aussi développer avec le système formamide benzène-isopropylamine. On obtient également deux taches mais leur ordre est inversé et les Rf obtenus plus élevés.

Conclusion :

L' α et le β -pinène ont été identifiés nettement par chromatographies sur plaque et sur papier après mercuration.

L'examen sur plaque de plusieurs échantillons commerciaux a donné des résultats assez constants.

Certaines taches sont absentes dans l'essence birectifiée étudiée.

ESSENCE DE THYM

ORIGINE

Essence retirée des sommités fleuries du Thym, *Thymus vulgaris* L., Labiées, par distillation à la vapeur.

COMPOSITION

Hydrocarbures : p-cymène (28-29 pour cent), α -pinène, camphène, caryophyllène.

Alcools : bornéol (3-8 pour cent), linalol (5 pour cent), géraniol, 4-terpinéol, β -hexénol, alcool amylique.

Phénols (25 à 30 pour cent) : thymol, carvacrol.

Travaux à consulter : RUNTI et BRUNI (1960).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Produit étudié : un échantillon commercial.

1) Chromatoplaques

A. — COMPOSÉS OXYGÉNÉS

Conditions opératoires

Acide silicique : Fluka (b).

Liquide mobile : chlorure de méthylène - éther isopropylique = 95-5.

Durée du développement : 1 h 10 mn.

Température : 20°.

Résultats

Rf	Vanilline H ₂ -SO ₄	O.D.A.	D.B.Q.C.I.- Na ₂ CO ₃	Interprétation
0,08	bl. g.	j. gt.		Géraniol (T. : 0,21) Bornéol (T. : 0,27) Linalol (T. : 0,34)
0,10	—			
0,11	j.			
0,14	bl. g.			
0,21	bl. +			
0,27	bl. +	j.		
0,34	bl. ++			
0,38	bl.			
0,42	mv. rs.			
0,45	bl.			
0,48	ve.	—	vi. ++ vi. ++++	Carvacrol (T. : 0,60) Thymol (T. : 0,67)
0,53	g. bl.			
0,60	—			
0,67	rs. (fc)+++			
0,75	bl. g.	gt.	—	
0,77	j. vet.	—	—	Hydrocarbures
0,94	vi.	—	—	

Les taches les plus importantes, celles du thymol et de son isomère le carvacrol, sont séparées d'une façon satisfaisante : la vanilline révèle le thymol en rose (assez fugace) ; le carvacrol n'est bien révélé qu'avec la dibromoquinonechlorimide.

En outre sont mis en évidence géraniol, bornéol, linalol.

B. — HYDROCARBURES

Conditions opératoires

Acide silicique : Kieselgel G Merck.

Liquide mobile : hexane.

Durée du développement : 1 h.

Température : 20°.

Résultats

Rf	SbCl ₃ visible	SbCl ₃ Wood	Interprétation
0,27	—	g. cl. ±	Caryophyllène ?
0,39	—	g. cl. ±	
0,48	—	g. cl. ±	
0,63	g.	cr.	
0,67	vi. mv.	g. mv.	
0,72	g.	g. cl.	
0,84	g.	g. cl.	α-pinène (T. : 0,93)
0,93	—	g. cl.	

2) Papier à la paraffine chlorée*Conditions opératoires*

Liquide mobile : acétone - eau : 50 - 50.

Parcours de la phase mobile : 175 mm.

Durée du développement : 5 h 15 mn.

Température : 20°.

Résultats

Rf	KMnO ₄ Na ₂ CO ₃	O.D.A.	D.B.Q.C.I. Na ₂ CO ₃	Interprétation
0,04	br.	—	—	Sesquiterpènes ?
0,19	—	jt.	—	
0,26	—	mv. gt.	—	
[0,37] 0,32	br.+++	—	bl. vi.+++	Thymol (T. : 0,37) Géranol (T. : 0,51)
0,51	br. (l.)	—	—	

Le linalol n'est pas nettement révélé. Par contre le géranol qui est également en faible proportion mais dont la tache est moins diffusible, est mis en évidence.

Le carvacrol est confondu ici avec le thymol.

3) Chromatographie après mercurisation*Conditions opératoires*

MILIEUX DE MERCURISATION

	α-pinène	Linalol	Essence
Produits	0,01 ml	0,01	0,02
} Réactif	0,75	0,25	0,25
} Méthanol	0,25	0,75	0,50
MICRODÉPOTS	2 µl	1 µl	3 µl

Résultats

Témoins	Essence	Interprétation
α-pinène : 0,14	0,07	
	0,14	
	0,22	
	0,27	
	0,35	
Linalol (a) : 0,45	0,45	
	0,55 (Cm)	
	0,75	
Linalol (b) : 0,80	0,80	
Ion mercurique : 0,89	—	

Conclusion :

Les chromatoplaques donnent des résultats satisfaisants pour cette essence complexe.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Les 17 essences officinales étudiées ont fait l'objet d'un grand nombre d'essais sur chromatoplaques et sur papiers hydrofugés. Si, pour quelques essences, ils ont été effectués sur trop peu d'échantillons pour apporter des résultats définitifs, cependant un certain nombre d'entre eux peuvent être pris en considération. Ainsi les constituants principaux de chacune de ces essences sont dans l'ensemble bien mis en évidence avec une grande sensibilité.

Seuls quelques composés ont été rebelles à une révélation satisfaisante par les techniques employées : camphre des essences de Lavandin, d'Aspic et de Romarin ; alcool phényléthylrique de l'essence de Rose ; cymène de diverses essences.

Un certain nombre de taches n'ont pu être interprétées, parce que la composition des essences est incomplètement connue, et surtout en raison de la difficulté de se procurer des témoins suffisamment purs.

Par ailleurs, des résultats intéressants ont été acquis dans la mise en évidence de caractères permettant de distinguer entre elles des essences de composition voisine : Cannelles de Ceylan et de Chine, Anis et Badiane, clous et feuilles de Girofle.

Nous nous proposons de poursuivre ce travail en l'orientant plus spécialement vers l'examen d'un plus grand nombre d'échantillons d'origine et d'âge connus afin de déterminer les taches constantes.

CHAPITRE V

**APPLICATION A LA CARACTÉRISATION
DES ESSENCES DANS LES PRÉPARATIONS
GALÉNIQUES**

Les méthodes chromatographiques proposées dans ce travail ont été mises au point en partant des essences elles-mêmes. Mais la nécessité de les caractériser se présente également lorsqu'elles entrent dans la composition de préparations galéniques.

Dans quelques cas, la préparation peut être soumise directement à la chromatographie : teintures d'essences, alcoolats, etc., mais la dilution est alors souvent trop élevée et certains composants peuvent échapper à la caractérisation.

D'une façon générale, il convient de recourir à un isolement préalable de l'essence soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par extraction à l'aide d'un solvant volatil comme le benzène, le chloroforme, le dichlorométhane (chlorure de méthylène), l'éther de pétrole, l'éther éthylique, le pentane, etc. La chromatographie est ensuite effectuée à partir de l'essence isolée, ou de sa solution, suffisamment concentrée, dans l'un des solvants ci-dessus.

L'extraction n'est pas toujours quantitative et il arrive fréquemment que l'on ne retrouve pas la totalité des taches observées pour l'essence originale. Mais il suffira souvent de se contenter de l'identification d'un ou plusieurs constituants caractéristiques de l'essence.

Les essences contenues dans les excipients liposolubles tels que les corps gras, les huiles végétales ou minérales, la vaseline, etc., pourront être distillées dans un appareil à entraînement continu à la vapeur d'eau comme celui proposé pour le Codex VIII^e éd. ou ceux des Pharmacopées helvétique (éd. V, suppl. III, p. 57) ou britannique (1958, p. 881). Cette technique, grâce à la mesure du volume d'essence distillée, présente l'avantage supplémentaire de fournir une évaluation, compte tenu des pertes inévitables.

La nature de ces pertes n'est pas sans importance. Elle peut concerner des composants plus difficilement entraînaibles, de telle sorte que la composition de l'essence distillée est différente de celle de l'essence initiale.

On peut réduire ces inconvénients dans une large mesure, en remplaçant l'eau du ballon à distiller par une solution de point d'ébullition plus élevé, une solution concentrée de chlorure de calcium par exemple. Il faut toutefois tenir compte que ces nouvelles conditions peuvent augmenter les risques d'altération des essences déjà signalés au cours de leur préparation (NAVES, 1960). Mais il

ne faut pas exagérer non plus ces derniers, surtout pour les essences obtenues par entraînement à la vapeur d'eau, cas le plus général.

Dans nos essais, nous avons séparé l'essence de 25 g d'huile à l'essence de Niaouli officinale (2 pour cent), en effectuant la distillation au contact de 350 g d'une solution à 50 pour cent p/p de chlorure de calcium et avons recueilli 88 pour cent de la quantité prévue. Le chromatogramme sur plaque obtenu avec cette essence, a été comparable à celui de l'essence matière première, ce qui n'a pas été totalement observé avec celle distillée en présence d'eau seule, les pertes atteignant alors 25 pour cent.

Lorsque l'on craint une altération, on peut utiliser l'appareil décrit par DOMANGE (1962), permettant l'extraction sous vide et à basse température des produits volatils.

En ce qui concerne les préparations dont l'excipient est aqueux, on peut s'inspirer de la technique décrite au Codex 1949, VII^e éd., pour le dosage des huiles essentielles dans les eaux distillées aromatiques : on dissout dans la préparation un sel — le chlorure de sodium ou le sulfate de sodium par exemple — afin d'empêcher les émulsions possibles, de diminuer la solubilité de l'essence dans la phase aqueuse et de rendre ainsi l'extraction par le solvant plus quantitative. La chromatographie est effectuée à partir de la solution d'essence, concentrée éventuellement par évaporation partielle du pentane, ou du résidu d'essence repris par une petite quantité de solvant volatil. Dans ce dernier cas on peut conjuguer le dosage pondéral (Codex) de l'essence après évaporation du pentane et la caractérisation sur plaque.

Les pâtes contenant des essences, comme les pâtes officinales à l'Eucalyptus, ou au menthol et à l'Eucalyptus, peuvent être soumises à une extraction selon la technique suivante que nous avons expérimentée :

Dans 100 ml d'eau distillée, faire dissoudre successivement 25 g de pâtes, puis 25 g de sulfate de sodium cristallisé. Extraire en une seule fois par 7 ml d'éther officinal. Recueillir la phase éthérée (1 à 1,5 ml) et, à partir de celle-ci, procéder à une chromatographie sur couche mince. Le cinéol et le menthol sont ainsi facilement identifiés après révélation par la vanilline sulfurique ou le trichlorure d'antimoine.

Les essences en solution dans un milieu alcoolique, sucré ou non (teintures d'essences, eaux de Cologne, élixirs, liqueurs, etc.), pourront être extraites par un solvant après dilution aqueuse, et on revient au cas précédent.

Parfois il est intéressant d'appliquer la chromatographie après mercuration. On peut alors mettre à profit les possibilités offertes par cette méthode pour la caractérisation de certains composés à l'état de traces. Grâce à leur affinité pour l'acétate mercurique, ils sont aisément extraits de solutions très diluées dans des solvants non miscibles au méthanol (éther de pétrole, huile de paraffine, etc.), par simple agitation avec une solution méthanolique d'acétate

mercurique¹. Les composés éthyléniques identifiables par cette méthode, réagissent avec l'acétate mercurique en formant des combinaisons organomercuriques, suffisamment polaires pour rester dissoutes dans la phase méthanolique où ils se concentrent. La chromatographie est ensuite effectuée à partir de celle-ci comme dans le cas habituel. A titre d'exemple, nous avons très facilement caractérisé la présence de traces (de l'ordre de 500 μ g) de limonène ou d'estragol en solution dans 10 ml d'éther de pétrole. La combinaison et l'extraction ont été opérées mécaniquement, en agitant ces solutions pendant 3 heures avec 1,5 ml de solution 0,02 M d'acétate mercurique dans le méthanol.

Cette technique a également permis de déceler sans difficulté l'estragol² dans une huile de paraffine médicinale renfermant, entre autres, 0,020 g d'essence d'Estragon pour 100 ml. Il a simplement suffi d'agiter, comme ci-dessus, 10 ml de la préparation telle quelle, avec la solution méthanolique d'acétate de mercure.

On peut aussi ajouter un extrait éthéré (éther éthylique) à la solution méthanolique d'acétate mercurique, puis laisser en contact un temps déterminé avant et après évaporation de l'éther sous un léger vide. Les composés organomercuriques formés sont suffisamment fixes, et l'on ne risque pas de pertes sensibles dans ces conditions opératoires.

Ces quelques exemples donnent un aperçu, non limitatif, des divers procédés utilisables pour l'extraction, puis la caractérisation chromatographique des essences dans leur formes galéniques. Ces méthodes peuvent d'ailleurs être appliquées dans le domaine de la parfumerie et de l'alimentation.

1. Eventuellement, la solution méthanolique peut être additionnée de traces d'eau, afin de diminuer les solubilités réciproques des deux phases.

2. Nous sommes heureux de remercier M. IGOLEN, Directeur technique aux Établissements Chiris, de nous avoir obligeamment fourni un échantillon d'estragol pour ces essais.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans ce travail, consacré à la caractérisation des essences officinales par chromatographie, nous avons d'abord rappelé les différentes étapes ayant marqué l'évolution de la chromatographie appliquée aux essences et à leurs constituants ; la partie consacrée à la chromatographie d'adsorption sur couche mince a été particulièrement développée, cette technique étant ici d'une importance majeure.

Les travaux personnels comprennent les trois chapitres généraux suivants :

- Chromatographie sur couche mince et
 - Chromatographie sur papiers hydrofugés des essences non transformées,
 - Chromatographie sur papier des essences, après « mercurisation »,
- suivis de deux autres consacrés respectivement aux :
- Applications aux essences officinales,
 - Applications à quelques formes galéniques.

A. *Dans la technique sur couche mince*, nous avons initialement opéré avec des supports liés par un gel d'amidon. Nous les avons abandonnées par la suite au profit d'acides siliciques spécialement conçus pour la chromatographie sur couche mince et contenant un liant minéral dont l'avantage est de permettre l'action de révélateurs agressifs.

Ayant également bénéficié au cours de ces essais des progrès réalisés dans les appareils applicateurs de couches minces, nous avons fixé notre choix sur des plaques d'assez grande taille (20 × 20 cm), afin de limiter les inconvénients des variations de Rf liées à l'effet de bord.

Parmi les divers solvants mobiles essayés, ont surtout été retenus les mélanges chlorure de méthylène - éther isopropylique et benzène - éther isopropylique. Ils se sont montrés particulièrement utiles dans la séparation de certains constituants (cinéol et acétate de linalyle) et nous avons adopté l'un ou l'autre dans l'étude systématique des essences officinales.

Par ailleurs ont été également utilisés des solvants mobiles classiques : l'hexane pour la chromatographie des hydrocarbures et, à titre exceptionnel, le mélange hexane - acétate d'éthyle qui réalise une meilleure séparation des alcools terpéniques et des citrals a et b.

Les techniques de révélation (fluorescence en lumière ultraviolette, vanilline sulfurique, trichlorure d'antimoine, 2,4-dinitro-

phénylhydrazine, o-dianisidine, etc.), déjà utilisées pour les constituants des essences, ont été perfectionnées ou simplifiées dans quelques cas. Nous avons ainsi proposé une méthode très sensible, mettant principalement en évidence les composés éthyléniques : la couche mince est rendue fluorescente par addition d'une substance telle que la rhodamine 6 G. Après développement des chromatoplaques, on révèle par les vapeurs d'iode sous lumière ultraviolette : les taches des constituants éthyléniques apparaissent sombres sur le fond jaune-vert.

B. *En chromatographie sur papiers hydrofugés*, nous avons été conduit à rechercher de nouveaux agents d'imprégnation, étant donné les résultats négatifs ou insuffisants déjà constatés dans les techniques antérieurement utilisées.

Divers hauts polymères ont été étudiés, parmi lesquels la cellulose nitrée (collodion officinal), l'éthylcellulose, le polyacétate de vinyle, le polychlorure de vinyle, le polyéthylènechlorosulfoné, le polyméthacrylate de méthyle, le polystyrène.

L'examen critique de l'action des solvants organiques sur ces polymères nous a orienté vers l'emploi de formes peu polymérisées — notamment celles d' α -méthylstyrène et de méthacrylate de méthyle — et de là, vers des composés comme les paraffines chlorées et les diphenyles chlorés.

Ces deux dernières catégories d'agents ont permis de réaliser les meilleures séparations des composants des huiles essentielles, spécialement des alcools terpéniques.

Afin d'obtenir des valeurs de Rf qui ne soient pas trop élevées et d'éviter la dissolution éventuelle de l'agent d'imprégnation, le pouvoir solvant de la phase mobile a été abaissé par addition soit d'eau à des liquides assez polaires (tétrahydrofuranne, acétone, méthanol), soit d'un éther fluoré spécial à des solvants plus lipophiles comme le trichlorotétrafluoroéthylène ou l'éther isopropylique.

Cette dernière conception nous paraît devoir créer de nouvelles possibilités en chromatographie de partage.

Dans l'ensemble, les révélations ne sont pas ici aussi sensibles et générales que dans la méthode sur plaque ; elles ont été effectuées avec des réactifs non agressifs, notamment le permanganate de potassium en milieu alcalin pour les composés éthyléniques, l'o-dianisidine pour les aldéhydes, la 2,4-dinitrophénylhydrazine pour les produits carbonylés.

C. *Dans la chromatographie sur papier des essences préalablement mercurisées*, nous avons tiré parti de la propriété que possèdent les doubles liaisons des constituants éthyléniques de fixer l'acétate mercurique en solution méthanolique. Les composés d'addition formés ont été chromatographiés sous leur forme hydroxyde, soit sur papier hydrofugé avec l' α -bromonaphtalène (phase mobile hydroacétonique), soit en phase non inversée sur papier imprégné de formamide (phase mobile à base d'hydrocarbures).

La révélation des composés organo-mercuriques eux-mêmes a été effectuée avec la diphenylcarbazone. Les réactions très sensibles données par celle-ci ont souvent permis de mettre en évidence une fraction de microgramme de substance. Cependant la chromatographie après mercuration est parfois d'interprétation délicate, par exemple en cas de « comètes » et de pluralité de taches, fait observé notamment avec les composés diéthyléniques. Cette question pose des problèmes qui mériteraient d'être étudiés spécialement.

Malgré ces inconvénients, cette technique permet de mettre en évidence un grand nombre de substances éthyléniques, parmi lesquelles l'anéthol, l'apiol, le citronellol, l'acétate de citronellyle, l'eugénol, l'acétyl-eugénol, le limonène, le β -pinène, etc.

D. A la suite de ce travail de mise au point, les 17 essences officinales suivantes ont fait l'objet d'une étude systématique avec chacune des trois techniques proposées :

Anis, Bergamote, Cannelle de Ceylan, Chénopode vermifuge, Citron, Eucalyptus, Girofle, Lavande, Lavandin, Menthe poivrée, Niaouli, Orange douce, Persil, Romarin, Rose, Térébenthine, Thym.

Les résultats donnés par les deux méthodes sur papier, bien que n'atteignant pas la valeur générale de ceux obtenus avec celle sur plaque, permettent cependant de confirmer l'identification de quelques composants d'essence et même parfois de résoudre à elles seules des cas particuliers.

La chromatographie sur couche d'acide silicique s'est montrée une technique de choix. Elle présente un ensemble d'avantages que même la chromatographie en phase gazeuse ne réunit pas entièrement : commodité de manipulation, rapidité de développement, possibilités de révélation très vastes, finesse des séparations, matériel peu onéreux.

Comme révélateur, la vanilline sulfurique à chaud a permis de mettre en évidence avec une sensibilité très élevée, la grande majorité des composés oxygénés des essences étudiées. Elle s'est montrée précieuse pour caractériser :

— les alcools terpéniques qui sont contenus pratiquement dans toutes les essences étudiées (bornéol, citronellol, géraniol, linalol, menthol).

— les esters de ces alcools dans les essences d'Hespéridées, de Lavandes, de Menthe, de Rose.

des aldéhydes : citral dans les essences d'Hespéridées et de Rose.

des cétones : menthone dans l'essence de Menthe.

des éther-oxydes : cinéol des essences de Badiane, Eucalyptus, Lavandes, Menthe, Niaouli, Chénopode vermifuge; anéthol des essences d'Anis et de Badiane; apiol dans l'essence de Persil.

— des phénols : thymol des essences de Thym et de Menthe; eugénol de celles de Cannelle de Ceylan, de Girofle et de Rose.

— des composés divers comme le menthofuranne (Menthe), l'ascaridol (Chénopode vermifuge).

D'autres réactifs ont permis de compléter ces résultats : 2,4-dinitrophénylhydrazine, o-dianisidine, 3-méthyl 2-benzothiazolone hydrazone et chlorure ferrique (aldéhydes aliphatiques), trichlorure d'antimoine. Ce dernier, possédant une valeur générale comme la vanilline sulfurique lui a été préféré pour la révélation des carbures terpéniques.

Les essences suivantes présentant des caractères voisins, ou sujettes à confusions, ont été particulièrement étudiées dans le but de faire ressortir leurs caractères distinctifs : Anis et Badiane, Cannelles de Ceylan et de Chine, Eucalyptus et Niaouli, clous et feuilles de Girofle, Lavande vraie, Lavandin et Lavande aspic.

E. Enfin un dernier chapitre a été consacré à la caractérisation des essences dans les préparations galéniques. Quelques exemples ont été décrits, montrant les nombreuses applications possibles dans le domaine de la pharmacie, de la parfumerie et de l'alimentation.

En conclusion, les méthodes utilisées dans ce travail ne sont pas limitées à la seule identification des constituants des essences. Non seulement elles s'étendent à la recherche des falsifications et à la mise en évidence des modifications au cours du vieillissement, mais elles peuvent apporter une aide dans la séparation d'autres substances lipophiles telles que les hormones stéroïdiques, ou de mélanges complexes comme les baumes, les résines, etc. Nous nous proposons de poursuivre des recherches dans cette voie.

S'il est bien connu que ces types de chromatographie ne donnent pas des valeurs de Rf absolument reproductibles, il n'en est pas moins certain qu'avec l'aide — indispensable — de substances pures ou d'essences témoins, ils sont susceptibles de fournir à l'analyste des moyens d'investigation sûrs, sensibles, commodes et même souvent irremplaçables.

BIBLIOGRAPHIE

- BASSIRI (T.). — Expansion et fixation des parfums et leurs applications aux plastiques. *La France et ses Parfums*, 1959, **2**, n° 10, 24-34.
- BERNHARD (R. A.). — Analyse et composition de l'essence de Citron par chromatographie de partage gaz-liquide. *J. Chromatog.*, 1960, **3**, 471-476.
- BIRKS (A. M.) et WRIGHT (G. F.). — Catalysis in the formation of α -méthoxymercurials from ethylenes. *J. am. chem. Soc.*, 1940, **62**, 2412-2421.
- BLAND (D. E.). — Separation of vanillin and syringaldehyde by paper partition chromatography. *Nature*, 1949, **164**, 1093.
- BLOCK (R. J.), DURRUM (E. L.) et ZWEIG (G.). — A Manual of paper chromatography and paper electrophoresis. *Academic Press* édit., New York, 1958.
- BOLLE (A.) et WENGER (P.). — Comment déceler analytiquement la présence des organomercuriels dans une préparation pharmaceutique. *Helv. Chim. Acta*, 1947, **30**, 538-539.
- BORECKY (J.), GASPARIC (J.) et VECERA (M.). — Identifizierung organischer Verbindungen XXV. Identifizierung und Trennung aliphatischer Alkohole C_1-C_{18} mittels Papierchromatographie. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1959, **24**, 1822-1828.
- BRIESKORN (C. H.) et WENGER (E.). — Analyse des ätherischen Salbeiöles mittels Gas- und Dünnschicht- chromatographie. 11-Mitteilung über die Inhaltsstoffe von *Salvia off.* L. *Arch. Pharm.*, 1960, **293**, 21-26.
- BRYANT (L. H.). — Circular chromatography of terpenes on adsorbent coated glass. *Nature*, 1955, **175**, 556.
- CALVARANO (I.). — I metodi cromatografici per l'analisi degli olii essenziali e dei loro costituenti — Rassegna bibliografica (1956-1959). *Essenze Deriv. Agrumari*, 1959, **29**, 195-216.
- CALVARANO (I.). — I metodi cromatografici per l'analisi degli olii essenziali e dei loro costituenti. Rassegna bibliografica (1956-1959). *Essenze Deriv. Agrumari*, 1960, **30**, 32-54 (suite).
- CALVARANO (M.). — Ricerche cromatografiche e spettrofotometriche sui costituenti dell'essenza di limone. *Essenze Deriv. Agrumari*, 1957, **27**, 173-187.
- CASTIGLIONI (A.) et PILLERI (R.). — Chromatographische Trennung des Geraniols von Linalool. *Z. Anal. Chem.*, 1960, **174**, 278-279.
- CERNY (J.). — Separation of 3,5-dinitrobenzoates of aliphatic alcohols by paper chromatography. *Chem. Listy*, 1955, **49**, 1899. *C.A.*, **50**, 9332 b.
- CHANG (W. H.), HOSSFELD (R. L.) et SANDSTROM (W. M.). — Identification of phenols by paper partition chromatography. *J. am. chem. Soc.*, 1952, **74**, 5766-5767.

- CHATT (J.). — The addition compounds of olefins with mercuric salts. *Chemical Reviews*, 1951, **48**, 7-43.
- CORTINA (B. R.) et MONTES (A. L.). — New method for investigating thujone in alcoholic drinks (absinthe, anisette, apéritifs, etc.). *Anales asoc. quim. Argentina*, 1954, **42**, 213-222. D'après C.A. **49**, 7804 e.
- DAS (M. N.). — Rapid estimation of ethylenes with mercuric acetate by non aqueous titration. *Analyt. Chem.*, 1954, **26**, 1086-1087.
- DELAVEAU (P.). — Sur la multiplicité des hétérosides à sénevol et leur relation avec la physiologie et la taxinomie des Crucifères. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 1957, **104**, 148-152.
- DELAVEAU (P.). — Recherches par chromatographie sur les graines d'un *Raphanobrassica*, hybride intergénérique. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 1961, **108**, 261-263.
- DELAVEAU (P.) et PARIS (R.). — Sur la composition chimique de l'essence de *Diplotaxis tenuifolia* (L.) D.C. *Ann. pharm. fr.*, 1958, **16**, 81-86.
- DEMOLE (E.). — Applications de la microchromatographie d'adsorption sur couches minces. *J. Chromatog.*, 1958, **1**, 24-34.
- DEMOLE (E.). — Progrès récents de la microchromatographie sur couches minces. *J. Chromatog.*, 1961, **6**, 2-21.
- DOMANGE (L.). — Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse dans l'analyse des médicaments. Quelques résultats pratiques obtenus au laboratoire. *Scientia Pharmaceutica*, 1962, **30**, 241-243.
- FEIGL (F.). — Spot tests in organic analysis. 5th ed., Elsevier, Amsterdam, 1956.
- FOXLEY (G. H.). — The detection of organic peroxides. *The Analyst*, 1961, **86**, 348-349.
- FREY (A.) et WEGENER (D.). — Trennung und Identifizierung von Aromastoffen in Weinsdestillaten. II - Trennung und Identifizierung der höheren Alkohole., 1957, **105**, 98-104.
- FRYDMAN (B. J.), MONTES (A. L.) et TROPAREVSKY (A.). — Chromatografía directa de aceites esenciales. Parte I. — Ajuste de la técnica y aplicación a componentes aromáticos y sus mezclas. *Anales Assoc. Quim. Argentina*, 1957, **45**, 248-256.
- FRYDMAN (B. J.), MONTES (A. L.) et TROPAREVSKY (A.). — Chromatografía directa de aceites esenciales. Parte II. — Aplicación en el estudio de aceites nacionales de explotación industrial. *Anales Asoc. Quim. Argentina*, 1957, **45**, 257-260.
- FRYDMAN (B. J.), MONTES (A. L.) et TROPAREVSKY (A.). — Chromatografía directa de aceites esenciales. Parte III. — Aplicación al estudio de aceites nacionales de composición poco conocida ó desconocida. *Anales Asoc. Quim. Argentina*, 1957, **45**, 261-264.
- FUJITA (M.) et NAGASAWA (M.). — Analysis of crude drugs by infra-red spectrophotometry. I. — Analysis of anethole containing drugs by infra-red spectrophotometry. *Yakugaku Zasshi*, 1960, **80**, 598-603. D'après C.A., **54**, 20092 h.
- FUKUSHI (S.) et OBATA (Y.). — The azulene of camphor blue oil. II. — Separation and identification of azulene by chromatography. *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 1953, **27**, 353-355. D'après C.A., **50**, 15027 f.

- FURUKAWA (T.). — Strip chromatography. IX. — Effects of the shape of the strip on Rf values. *Nippon Kagaku Zasshi*, 1959, **80**, 45-47. D'après C.A., **54**, 4107 f.
- FURUKAWA (T.). — Strip chromatography. X. — Separation of phenols, aromatic aldehydes, ketones and carboxylic acids by means of chromatostrips. *Nippon Kagaku Zasshi*, 1959, **80**, 387-389. D'après C.A., **54**, 13938 e.
- GASPARIC (J.) et VECERA (M.). — Identification of organic compounds. XIV. — Separation and identification of aliphatic aldehydes and ketones by paper chromatography. *Chem. Listy*, 1957, **51**, 287-291. D'après C.A., **51**, 6437 c.
- GILDEMEISTER (E.) et HOFFMANN (F.). — Die ätherischen Öle. Akademie-Verlag, Berlin, 7 tomes, 1956-1961.
- GOGROF (G.). — Untersuchungen über das ätherische Öl, die Sesquiterpene und die Drüsenhaare von *Pogostemon Patchouli* Pell. *Pharmazie*, 1957, **12**, 38-51.
- GREEN (J.) et MARCINKIEWICZ (S.). — Separation and identification of phenols by paperchromatography. *Nature*, 1955, **176**, 1172-1173.
- GROTE (I. W.). — A new color reaction for soluble organic sulfur compounds. *J. biol. Chem.*, 1931, **93**, 25-30.
- GUENTHER (E.). — The essential oils. D. Van Nostrand Company, Inc., Toronto, New York, London, 6 tomes, 1948-1952.
- GUENTHER (E.) et LANGENAU (E. E.). — Essential oils and related products. *Analyt. Chem.*, 1953, **25**, 12-17 ; 1955, **27**, 672-677.
- GUENTHER (E.), KULKA (K.) et ROGERS (J. A.). — Essential oils and related products. *Analyt. Chem.*, 1957, **29**, 630-637 ; 1959, **31**, 679-687 ; 1961, **33**, 37 R-45 R.
- GULATI (B. C.) et SADGOPAL. — Indian Valerian oil. Chemical examination of the essential oil from the rhizomes and roots of *Valeriana wallichii* D.C. Part 2. Study of the water-soluble constituents. *Soap Perf. and Cosm.*, 1956, **29**, 1129-1132.
- HARADA (T.) et SAIKI (Y.). — Pharmaceutical studies of Japanese wild Ginger II. — Paper chromatography of essential oils. *Pharm. Bull.*, 1956, **4**, 223-224.
- HAYASHI (K.) et HASHIMOTO (Y.). — Studies on the microanalysis of essential oil components. II. — The paper chromatography of essential oil components by silicone treated paper. *Pharm. Bull.*, 1956, **4**, 496-497.
- HAYASHI (K.) et HASHIMOTO (Y.). — Studies on the microanalysis of essential oil components. III. — The detection of aldehydes by paper chromatography. *Pharm. Bull.*, 1957, **5**, 74-77.
- HAYASHI (K.) et HASHIMOTO (Y.). — Studies on the microanalysis of essential oil components. IV. — The spot test of essential oil components by antimony pentachloride. *Pharm. Bull.*, 1957, **5**, 611-613.
- HELLYER (R. O.) et McKERN (H. H.). — *Melaleuca viridiflora* and its essential oils. *J. Proc. Roy. Soc. N.S. Wales*, 1955, **89**, Pt 4, 188-193 (Pub. 1956). D'après C. A., **53**, 14424 g.
- HOPKINS (L. V.) et BLAKE (M. I.). — Paper chromatographic evaluation of menthol. *J. am. pharm. Assoc.*, 1959, **48**, 222-224.

- ILLARI (G.) et COGHI (L.). — Chromatographic detection of apiole. *Ateneo parmense*, 1957, **28**, 243-247. D'après C.A., **51**, 18485 c.
- INDOVINA (R.), DE LEO (E.), CAMMARATA (R.) et DE CRISTOFORIS (V.). — Comportamento cromatografico su carta delle aldeidi. *Ann. Chim. (Rome)*, 1955, **45**, 1041-1044.
- ITO (M.), WAKAMATSU (S.) et KAWAHARA (H.). — Japanese Mint VII. — Chromatostrips for the constituents of the Japanese Mint oil. *J. Chem. Soc. Jap., Pure Chem. Sect.*, 1953, **74**, 699. D'après C.A., **48**, 3640 b.
- ITO (M.), WAKAMATSU (S.) et KAWAHARA (H.). — Japanese Mint VII. — Chromatostrips of constituents of Japanese Peppermint oil. *J. Chem. Soc. Jap., Pure Chem. Sect.*, 1954, **75**, 413-416. D'après C.A., **48**, 13172 d.
- IVANOV (D.), STOIANOVA-IVANOVA (B.) et IVANOV (Ch.). — The composition of the hydrocarbons isolated from the wax of Bulgarian roses. *C.R.Ac. bulg. Sci.* 1955, **8**, 32-36 D'après C.A., **50**, 11688 d.
- IVANOV (D.), PANAIOTOV (I. M.), TCHORBADJIEV (S.) et BELITCHEVA (V.). — The acids and esters in Rose oil. *Perfumery Essent. oil Record*, 1960, **51**, 609-610.
- IZMAILOV (N. A.) et SHRAIBER (M. S.). — *Farmatsiya*, 1938, n° 3, 1-7. D'après LEDERER (1959).
- JASPERSEN-SCHIB (R.). — Beitrag zur Prüfung und Normung von Oleum Menthae mittels Dünnschichtchromatographie. *Pharm. Acta Helv.*, 1961, **36**, 141-152.
- JASPERSEN-SCHIB (R.) et FLUCK (H.). — Identitäts- und Reinheitsprüfung von Atherischen Ölen mittels Dünnschichtchromatographie. *Boll. Chim. Farm.*, 1962, **101**, 512-518.
- JOPPIEN (P. H.). — Nachweis und Bestimmung von Thujon mittels Papierchromatographie, ein Beitrag zur Analytik der Aldehyde und Ketone der Terpenreihe. *Z. Lebensm.—Untersuch. u. Forsch.* 1956, **104**, 393-401.
- KAISTHA (K. K.). — Gravimetric estimation of camphor via its semicarbazone. *Drug Standards*, 1956, **24**, 141-144.
- KARIYONE (T.), HASHIMOTO (Y.) et KIMURA (M.). — Paper partition chromatography of alcohols with the potassium xanthogenates. *Nature*, 1951, **168**, 511.
- KARIYONE (T.) et HAYASHI (K.). — Studies on the microanalysis of essential oils components. I. — The paper chromatography of Terpene alcohol by using Anthranilate. *Pharm. Bull.*, 1956, **4**, 494-495.
- KATAYAMA (T.). — The volatile constituents of seaweed. III. — The terpenes of volatile constituents of *Ulva pertusa*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fisheries*, 1955, **21**, 412-415. D'après C.A., 1956, **50**, 13184 a.
- KATAYAMA (T.). — IV. — The carbonyl compounds of volatile constituents of *Ulva pertusa*. *Ibid.*, 416-419. D'après C.A., 1956, **50**, 13184 c.
- KIRCHNER (J. G.), MILLER (J. M.) et KELLER (G. J.). — Separation and identification of some terpenes by a new chromatographic technique. *Analyt. Chem.*, 1951, **23**, 420-425.

- KJÆR (A.). — Naturally occurring isothiocyanates (Mustard oils). A survey, with a special view to recent work. *Dansk. Tids. Farm.*, 1956, **30**, 117-135.
- KLEIN (F.) et DE JONG (K.). — Paperchromatography of 2,4-dinitrophenylhydrazones of aliphatic carbonyl compounds. *Rec. Trav. Chim.*, 1956, **75**, 1285-1288.
- KNESSL (O.) et VLASTIBOROVA (A.). — Über Terpene. LVL. Papier chromatographie der Azulene. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1954, **19**, 782-787.
- KONDO (S.). — Studies on qualitative and quantitative determination of essential oils. I. — Separation of essential oils by papyrography. *J. Pharm. Soc. Jap.*, 1957, **77**, 694-696.
- KRUPSKI (E.) et FISCHER (L.). — A comparative study of Oregon and Washington Peppermint oils. *J. am. pharm. Assoc.*, 1950 **39**, 433-436.
- LEDERER (E.). — Chromatographie en chimie organique et biologique. Masson édit., 1959, vol. 1.
- LEE (L. A.) et CARUSO (V. J.). — Methods of distinguishing sources of nutmeg and mace. *J. Assoc. offic. Agr. Chem.*, 1958, **41**, 446-449.
- LEMLI (J.A.J.M.). — De Vluchtige oli van *Mentha piperita* L. Gedurende de Ontwikkeling van de Plant. J. B. Wolters édit., Groningen, 1955.
- LEMLI (J.A.J.M.). — Colloque sur les plantes médicinales. Angers, 19 mai 1963.
- LONGUEVALLE (S.). — Chromatographie de partage gaz-liquide-Application au contrôle des médicaments. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1960. Sedes édit.
- LYNN (W. S.), STEELE (L. A.) et STAPLE (E.). — Separation of 2,4-dinitrophenylhydrazones of aldehydes and ketones by paper chromatography. *Analyt. Chem.*, 1956, **28**, 132-133.
- MARQUARDT (R. P.) et LUCE (E. N.). — Determination of unsaturation in dehydrogenated dichloroethylene by use of mercuric acetate. *Analyt. Chem.*, 1949, **21**, 1194-1200 et 1950, **22**, 363 (erratum).
- MARTIN (R. W.). — Rapid estimation of ethylenes. *Analyt. Chem.*, 1949, **21**, 921-922.
- MEIGH (D. F.). — Separation of the 3,5-dinitrobenzoates of volatile alcohols by paper chromatography. *Nature*, 1952, **169**, 706-707.
- MEINHARD (J. E.) et HALL (N. F.). — Surface chromatography. *Analyt. Chem.*, 1949, **21**, 185-188.
- MILLER (J. M.) et KIRCHNER (J. G.). — Chromatostrips for identifying constituents of essential oils. *Analyt. Chem.*, 1953, **25**, 1107-1109.
- MITCHELL (J.), KOLTHOFF (J. M.), PROSKAUER (E. S.) et WEISSBERGER (A.). — *Organic analysis*, 1956, vol. III, 301-310. Interscience Publishers, Inc., New York.
- MONOD (Cl.) et DE DORTAN (D.). — L'essence de graines d'Anis et de Fenouil. *Industrie de la Parfumerie*, 1955, **5**, 401-406.
- MUHLBERGER (F. H.). — Der papier chromatographische Nachweis von Eugenol und Anisaldehyd in Dessertwein und weinhaltigen Getränken. *Z. Anal. Chem.*, 1954, **143**, 21-30.

- NAVES (Y. R.). — Études sur les matières végétales volatiles (XXXIV). Sur la composition de l'huile essentielle de Lavandin. *Helv. Chim. Acta*, 1945, **28**, 1220-1226.
- NAVES (Y. R.). — Études sur les matières végétales volatiles CLXIII. Présence de bornéol et de camphre, mais non d'acétate de bornyle, dans les huiles essentielles de Lavande et de Lavandin. *Helv. Chim. Acta*, 1959, **42**, 2744-2750.
- NAVES (Y. R.). — Progrès récents dans la chimie des huiles essentielles. *Bull. Soc. chim. Fr.*, 1960, 5^e série, 1517-1528.
- NAVES (Y. R.), OCHSNER (P.) et TULLEN (P.). — Étude sur les matières végétales volatiles CLXVIII. Sur les époxydes de l'huile essentielle de Lavande. *Helv. Chim. Acta*, 1960, **43**, 1616-1619.
- NAVES (Y. R.) et TULLEN (P.). — Études sur les matières végétales volatiles CLXIX. Sur les terpènes de l'huile essentielle de Lavande. *Helv. Chim. Acta*, 1960, **43**, 1619-1623.
- NAVES (Y. R.) et TULLEN (P.). — Études sur les matières végétales volatiles CLXIX. Présence de (+)-nopinène et de sabinène dans l'huile essentielle de Lavande. *Helv. Chim. Acta*, 1960, **43**, 2150-2152.
- NAVES (Y. R.) et TULLEN (P.). — Études sur les matières végétales volatiles CLXVIII. Sur les terpènes de l'huile essentielle de Lavande : ocimène, α -pinène, camphène. *Helv. Chim. Acta*, 1961, **44**, 316-319.
- NEWCOMBE (A. G.) et REID (S. G.). — Chromatographic separation, using chemically treated paper, of aldehydes and ketones on the basis of their reactivity. *Nature*, 1953, **172**, 455-456.
- NOMURA (D.). — Manufacture of natsudaïdai (a chinese Citron juice). VI. — Estimation of terpenes in the juice. *J. Fermentation Technol.* (Japan), 1953, **31**, 228-230. D'après *C.A.*, **47**, 7693 i.
- NONAKA (M.), PIPPEN (E. L.) et BAILEY (G. F.). — Separation and identification of n-alkanals, 2-alkanones, 2-alkenals and 2,4-alkadienals by paper chromatography and direct spectrophotometric examination. *Analyt. Chem.*, 1959, **31**, 875-877.
- ONOE (K.). — The separation and identification of aliphatic aldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazones by the chromatostrip method. *J. Chem. Soc. Jap., Pure Chem. Sect.*, 1952, **73**, 337-339. D'après, *C.A.*, **47**, 3759 c.
- PANAIOTOV (I. M.). — On carbonyl compounds in Clary Sage oil. *Perfumery Essent. oil Record*, 1958, **49**, 233-234.
- PANAIOTOV (I. M.) et IVANOV (D.). — On the aldehydes of Rose oil. *Perfumery Essent. oil Record*, 1958, **49**, 231-232 et *Bulgar. Akad. Nauk. Izvest. Khim. Inst.*, 1958, **6**, 281-292. D'après *C.A.*, **54**, 18892 b.
- PANAIOTOV (I. M.) et IVANOV (D.). — On Alcohols in Rose Oil. *Perfumery Essent. Oil Record*, 1959, **50**, 676-677.
- PARIS (R.). — Caractérisation et dosage de divers hétérosides par chromatographie sur papier. *Prod. Pharm.*, 1960, **15**, 347-351.
- PARIS (R.). — Progrès récents dans le contrôle des médicaments par chromatographie et électrophorèse sur papier. *Mises au point de chimie analytique*, Masson édit., 1961 (9^e s.).

- PARIS (R.). — Chromatographie sur papier et sur couche mince des alcaloïdes. II^e symposium sur la chromatographie. Bruxelles sept. 1962. *J. Pharm. Belg.*, 1963 (sous presse).
- PARIS (R.) et GODON (M.). — Analyse des huiles essentielles par chromatographie sur papier et sur plaques. Application à quelques essences officinales. *Ann. pharm. fr.*, 1961, **19**, 86-93.
- PESEZ (M.) et POIRIER (P.). — Méthodes et réactions de l'analyse organique. 1954, tome III, 5. Masson éditeur.
- PESEZ (M.). — 2,4-dinitrophenylhydrazine, a suitable reagent for the colorimetric determination of carbonyl compounds. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1959, **11**, 475-476.
- PEYRON (L.). — Micro recherche qualitative des composés carbonylés par chromatographie radiale de leurs hydrazones. *La France et ses Parfums*, 1959, **2**, n° 12, 41-48.
- POHLOUDEK-FABINI (R.) et BEYRICH (Th.). — Beitrag zur Papierchromatographie von Alkoholen als Xanthogenate. *Naturwissenschaften*, 1957, **44**, 512-513.
- POHLOUDEK-FABINI (R.) et LUTHARDT (K.). — Papierchromatographischer Nachweis von Estern niederer Fettsäuren in ätherischen Ölen. *Naturwissenschaften*, 1958, **45**, 314.
- POHLOUDEK-FABINI (R.) et LUTHARDT (K.). — Bestimmung von Estern niederer Fettsäuren in ätherischen Ölen. 4. Mitteilung. Mikroanalytik ätherischer Öle. *Pharm. Zentralhalle*, 1960, **99**, 488-492.
- RAYBURN (C. H.), HARLAN (W. R.) et HANMER (H. R.). — Determination of volatile phenols in cigarette smoke. *Analyt. Chem.*, 1953, **25**, 1419.
- REITSEMA (R. H.). — Characterization of essential oils by chromatography. *Analyt. Chem.*, 1954, **26**, 960-963.
- RIGANESIS (M. D.). — I metodi cromatografici per l'analisi degli olii e essenziali e dei loro costituenti. Rassegna bibliografica quinquennale. *Essenze Deriv. Agrumari*, 1955, **25**, 17-44.
- RIGANESIS (M. D.). — I metodi cromatografici per l'analisi degli olii essenziali e dei loro costituenti. II Nota. *Essenze Deriv. Agrumari*, 1956, **26**, 29-61.
- RIGANESIS (M. D.) et CALVARANO (M.). — Ricerche cromatografiche e caratterizzazione delle aldeidi nell'essenza di Mandarinino. *Essenze Deriv. Agrumari*, 1956, **26**, 167-177.
- ROBERTS (H. M.). — Chlorinated paraffins. *Encyclopedia of chemical technology*. Vol. 3, 781-786. The Interscience Encyclopedia, Inc., New York, 1949.
- RODIGHERO (G.), CAPORALE (G.) et RAGAZZI (E.). — The coumarins present in *Ruta graveolens*, in the leaves of *Ficus carica* and in the essence of *Citrus limonum*. *Atti ist. veneto sci. lettere ed. arti., classe sci., mat. e nat.*, 1952-1953, **111**, 125-131. D'après *C.A.*, **48**, 14116 h.
- RUNTI (C.) et BRUNNI (G.). — Applicazione della cromatografia gassosa all'analisi di olii di Timo. *Boll. Chim. Farm.*, 1960, **99**, 435-447.
- SABETAY (S.) et TRABAUD (L.). — Sur la présence de citral dans l'essence de Bergamote. *Bull. Soc. chim. France*, 1943, **10**, 35.

- SAWICKI (E.), HAUSER (T. R.), STANLEY (T. W.) et ELBERT (W.). — The 3-methyl 2-benzothiazolone hydrazone test. Sensitive new methods for the detection, rapid estimation and determination of aliphatic aldehydes. *Analyt. Chem.*, 1961, **33**, 93-96.
- SCHENCK (G.) et FROMMING (K. H.). — Über die Bestimmung des Azulens im ätherischen Öl der Kamille. *Naturwissenschaften*, 1953, **40**, 276.
- SCHULTE (K. E.) et STORP (C. B.). — Die papierchromatographische analyse von Aldehyden und Ketonen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1955, **57**, 36-42 et 600-604.
- SEIDEL (C. F.) et STOLL (M.). — Zur Kenntnis des Rosenöls. I Mitteilung. Über die tiefsiedenden Bestandteile des bulgarischen Rosenöls. *Helv. Chim. Acta*, 1959, **42**, 1830-1844.
- SEIDEL (C. F.), FELIX (D.), ESCHENMOSER (A.), BIERMANN (K.), PALLUY (E.) et STOLL (M.). — Zur Kenntnis des Rosenöls-2 Mitteilung. Die Konstitution des Oxyds $C_{10}H_{18}O$ aus bulgarischen Rosenöl. *Helv. Chim. Acta*, 1961, **44**, 598-606.
- SHICHIJI (S.) et HAYASHI (M.). — Paper chromatographic separation of alcohols as alkylhydrogenphthalates. *Kogyo gijutsuin Makkō Kenkyūsho Kenkyū Hōkoku*, 1957, n° 14, 15-17. D'après C.A. **52**, 12677 i.
- SHIMIZU (S.). — Paper chromatography of ketone betaïnylhydrazones in Peppermint oil. *J. Shinshu Univ.*, 1954, n° 4, 304-307 (résumé anglais : 320-321). D'après C.A., **50**, 10346 b.
- SIEGEL (A.) et SCHLÖGL (K.). — Papierchromatographische Trennung und Identifizierung von einwertigen Alkoholen. III. Mitteilung. über Papierchromatographie organischer Säuren. *Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta*, 1953, **40**, 383-389.
- SPENGLER (G.), FRÖMMEL (M.), SCHÄFF (R.), FAUL (Ph.) et LONSKY (P.). — Über Quecksilber — Anlagerungsverbindungen der Olefine und deren möglichen Einsatz zur Olefin Abtrennung. *Brennstoff-Chemie*, 1956, **37**, 47-53.
- SPITERI (J.). — Chromatographie de partage des acides gras. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 1355-1362.
- STAHL (E.) et coll. — Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer-Verlag édit., 1962.
- STANLEY (W.-L.) et VANNIER (S. H.). — Analysis of coumarin compounds in Citrus oils by liquid-solid partition. *J. Assoc. offic. Agric. Chemists.*, 1957, **40**, 582-588.
- STANLEY (W. L.) et VANNIER (S. H.). — Chemical composition of a series of substituted coumarins. *J. am. chem. Soc.*, 1957, **79**, 3488-3941.
- SWISHER (H. E.). — Citrus essential oil composition. *Drug. Cosm. Ind.*, 1962, **90**, 415-417.
- SYKORA (V.) et VOKAC (K.). — Terpenes CXI. A new modification of paper chromatography of azulenes. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1960, **25**, 1702-1704. D'après C.A., **54**, 17452 i.
- THEILE (F. C.), DEAN (D. E.) et SUFFIS (R.). — The evaluation of Bergamot oil. *Drug. Cosm. Ind.*, 1960, **86**, 758, 759, 837, 838, 839.
- THOMPSON (A. R.). — Volatile products of Apples. I. — Identification of acids and alcohols. *Australasian J. Sci. Research*, 1951, **B4**, 283-290. D'après C.A., **46**, 193 g.

- WAGNER (G.). — Die Trennung einiger flüchtiger Phenole nach dem "Chromatoplate-Verfahren". *Pharmazie*, 1955, **10**, 302-304.
- WATANABE (T.) et TASAKA (Y.). — Volatile components of Mulberry leaves. III. — Aldehydes and ketones by paper chromatography. *J. Sericult. Sci. Japan*, 1952, **21**, 106-108. D'après *C.A.*, **48**, 2269 f.
- WHITE (J. W.) et DRYDEN (E. C.). — Separation of aliphatic alcohols by chromatographic adsorption of their 3,5-dinitrobenzoates. *Analyt. Chem.*, 1948, **20**, 853-855.
- WINKLER (W.) et LUNAU (E.). — Zur Unterscheidung der ätherischen Öle von *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. und *Curcuma longa* L. durch Dünnschicht-Chromatographie. *Pharm. Ztg.*, 1959, **104**, 1407-1408.
- WOLLISCH (E. G.), SCHMALL (M.) et HAWRYLYSHYN (M.). — Thin-layer chromatography. Recent developments in equipment and applications. *Analyt. Chem.*, 1961, **33**, 1138-1142.
- WULFF (H. D.) et STAHL (E.). — "Chemische Rassen" bei *Acorus calamus*. *Naturwissenschaften*, 1960, **47**, 414.
-

Vu, le Doyen
G. VALETTE

Vu, le Président
R. PARIS

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE

5286 — IMPRIMERIE KAPP VANVES (SEINE)
